

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR
HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. H. ALDERSHOFF (Utrecht), Prof. Dr. L. DE BLIECK
(Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. Bijl (Utrecht), Dr. W.
DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam),
Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOFDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG
(Groningen), Prof. A. KLEIN (Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr.
J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN
(Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen),
A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOHA WESTERDIJK (Baarn),
Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMACHTSAPPIJ, AMSTERDAM

All rights reserved

INHOUD JAARGANG 1936.

	Blz.
DR. A. C. BRANDWIJK, zie DR. A. TASMAN.	
DR. A. C. BRANDWIJK, zie DR. W. AEG. TIMMERMAN.	
MEJ. DR. J. C. H. BROEK, Gonococcensepsis met meningitis gonococcica bij blennorrhoe	49
DR. W. J. BRUINS SLOT, Eenige serologische bijzonderheden bij klierkoorts	57
DR. J. P. BIJL en J. DOMISSE, Over besmetting van fretten met het gorgelwater van grieppatiënten	165
W. A. COLLIER, De pneumococcenimmunitet van de witte muis tegen pneumonie en sepsis	1
J. DOMISSE, zie DR. J. P. BIJL.	
PROF. DR. P. C. FLU, De verdere lotgevallen van de Vereeniging . . .	101
PROF. DR. W. C. DE GRAAFF, Bacterium pneumoniae en Bacterium lactis aerogenes	18
E. HARMSSEN, Microbiologische moeilijkheden bij het kweken van groote hoeveelheden wortelknolletjesbacteriën	274
DR. JAC. JANSEN, Eendensalmonellose en hare beteekenis voor den mensch	184
DR. JAC. JANSEN, Salmonellose der eend als oorzaak van voedselvergiftiging (consumptie-ijis) bij den mensch	241
PROF. A. KLEIN, Over de oprichting der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	92
PROF. DR. W. A. KLUYVER, De wereld der microben: verleden, heden, toekomst	110
DR. K. DE KONING, Salmonellose der eend als oorzaak van voedselvergiftiging (consumptie-ijis) bij den mensch	238
MEJ. A. W. DE LIND VAN WIJNGAARDEN, zie DR. A. PONDMAN.	
DR. J. MULDER, De huidige stand van het probleem der zoogenaamde septische „influenza“-meningitis	306
DR. H. J. VAN NEDERVEEN, Professor Dr. D. A. de Jong-Stichting	183, 253
DR. H. J. VAN NEDERVEEN, Verslag der Vergadering van de Nederl. Vereeniging voor Microbiologie	83, 254
DR. A. PONDMAN en MEJ. A. W. DE LIND VAN WIJNGAARDEN, Coli-toxine	244
JONKVROUWE M. VAN RIEMSDIJK, Een verbeterde serologische pipet en over de druppelgrootte van verschillende vloeistoffen	170
DR. R. TH. SCHOLTENS, De verkregen resistentie tegen de bacteriophag	77
W. C. SMIT, Differentiatie van in boterzuursels voorkomende melkzuurbacteriën	40

DR. R. STOOP, Over de activeering van filtreerbare elementen van den tuberkelbacil door middel van inspuitingen met het aceton-extract van Kochsche bacillen	322
DR. A. TASMAN en DR. A. C. BRANDWIJK, Stofwisselingsproeven met C. Diphtheriae I	134
DR. W. AEG. TIMMERMAN en DR. A. C. BRANDWIJK, Vergelijkende onderzoekingen over de immuniseerende werking van onverdund en verdund diphtherie-anatoxine	28
DR. J. W. DE WAAL, Het Schema-1935 van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid voor het bacteriologisch onderzoek van drinkwater	355
DR. N. VAN DER WALLE, Over het vetsplitsend vermogen van Staphy- lococci	334
K. T. WIERINGA, Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden	263
BOEKAANKONDIGINGEN	77, 180

De pneumococconimmunititeit van de witte muis tegen pneumonie en sepsis ¹⁾.

DOOR

W. A. COLLIER.

De hieronder te beschrijven proeven hadden ten doel vast te stellen, in hoeverre men door intraperitoneale, resp. pulmonale immunisatie tegen pneumococcon (type 1), een immunititeit tegen pneumococcensepsis of -pneumonie verkrijgen kan.

Immuniseeren door toevoer van antigeen in de longen is niet nieuw. Volgens *Bieling* lukt het door inbrengen van antigeen in de longen, door middel van tracheale injectie, op gelijksoortige wijze te immuniseeren, als langs intraveneuzen weg. Over dergelijke proeven op laboratoriumdieren meldt *Pfenninger*; virulente kiemen zouden tracheaal beter verdragen worden.

Volgens *Schewelev* kan men honden tegen diphtherie tracheaal, laryngeaal en door inhalatie even goed immuniseeren, als langs subcutanen weg. Op eenigszins andere wijze immuniseerden *Blumenthal*, zoowel als *Kaneko* groote dieren tegen diphterietoxine door het toxine direct in de longen te injecteren. Zij beweren op deze wijze een sterkere productie van antitoxine te krijgen en deze methode wordt volgens *Bieling* in Russische serum-instituten toegepast. *Besnoit*, *Leclainche* en *Morel* zouden runderen tracheaal tegen bij de voeding verkregen tuberculose geïmmuniseerd hebben.

Cecil en *Steffen* immuniseerden apen tracheaal met doode pneumococcon en verkregen hierdoor een duidelijke bescherming tegen een erop volgende tracheale infectie, die anders bij apen een pneumonie veroorzaakt. Minder goed waren de resultaten, als de smetstof door inhalatie werd ingebracht. *Stillman* probeerde muizen door ver 'spray' en van doode pneumococcon te immuniseeren. Na een 4—8 keer herhaalde behandeling bleken echter slechts 6 % van de dieren immuun tegen een erop volgende intraperitoneale infectie. Betere resultaten verkreeg hij met levende pneumococcon, want hier bleken na twee keer be 'spray' en 22 % en na tien keer zelfs 66 % immuun te zijn tegen een intraperitoneale infectie. *Lange* toonde

¹⁾ Voordracht te Utrecht gehouden op 23 November 1935 voor de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie.

eveneens aan, dat door inhalatie van levende pneumococcen een bescherming tegen er op volgende intraperitoneale infectie kan optreden. *Eguchi* immuniseerde muizen met bij 100° gedooide pneumococcen door inhalatie tegen de 100-voudig doodelijke dosis na intraperitoneale infectie. *Collier* immuniseerde muizen pulmonaal in aethernarcose en vond een duidelijke immuniteit tegen er op volgende intraperitoneale infectie, een minder duidelijke tegen er op volgende pulmonale. Ook bij de proeven van *Neufeld* en *Etinger-Tulczynska* over nasale immunisering met doode pneumococcen (zonder narcose), die een hooge immuniteit tegen intraperitoneale infectie ten gevolge hadden, zijn zonder twijfel enkele kiemen in de longen terecht gekomen, zoodat ook hier gedeeltelijk een pulmonale immunisering zou hebben plaats gehad.

De pulmonale infectie met pneumococcen.

Terwijl *Blake* en *Cecil*, *Cecil* en *Steffen* bij apen door tracheale injectie van kleine hoeveelheden pneumococcen met zekerheid een typische lobaire pneumonie konden veroorzaken, waren *Stillman* en *Branch* niet in staat bij de muis door inhalatie een pneumonie te veroorzaken; integendeel gingen de dieren alle aan septicaemie, zonder localisering in de long, te gronde. Werd het afweervermogen van de long door acute alcoholvergiftiging verminderd, dan werden door inhalatie wel meer dieren geïnfecteerd, maar ook dan stierven ze alle aan septicaemie. Eerst wanneer de muizen door herhaalde inhalatie van levende of doode pneumococcen gedeeltelijk geïmmuniseerd waren, ontstonden bij hernieuwde inhalatie van levende kiemen typische lobaire pneumonieën.

Veel beter zijn de resultaten, door *Neufeld* en *Kuhn* verkregen, die, met gebruikmaking van de door *Shope* aangegeven techniek bij nasale infectie, zware pneumococcenpneumonieën bij muizen konden doen ontstaan. Deze infectie-methode, die men wel zonder bezwaar als pulmonale infectie betitelen mag, werd ook door *Neufeld* en *Collier* bij hun therapeutische proeven met succes gebruikt.

Helaas echter geeft de pulmonale infectie in aethernarcose niet in alle gevallen, zelfs bij gebruik van de geheele cultuur, een doodelijke pneumonie; integendeel blijft een deel van de dieren leven. De longen van de muis schijnen, in tegenstelling tot de longen van de aap (en waarschijnlijk ook van den mensch), een buitengewoon sterk afweermecanisme tegen een pneumococceninfectie te bezitten, terwijl er in het bloed nauwelijks afweerkrachten te bekennen vallen.

Het is daarom wellicht interessant een overzicht te geven van het gedrag van groote aantallen muizen uit verschillende proeven na pulmonale infectie in aethernarcose. In *tabel 1* zijn proeven met 182 muizen weergegeven, die met verschillend materiaal en verschillende verdunningen geïnfecteerd zijn.

TABEL 1.

Infectie	In leven	% levend	% dood
$\frac{1}{1}$ cultuur, 24 uur, 1 \times .	$\left. \begin{array}{l} 8 : 2 \\ 8 : 2 \\ 8 : 2 \\ 8 : 2 \\ 6 : 2 \end{array} \right\} 38 : 10$	$\left. \begin{array}{l} 25 \\ 25 \\ 25 \\ 25 \\ 33,3 \end{array} \right\} 26,3$	$\left. \begin{array}{l} 75 \\ 75 \\ 75 \\ 75 \\ 66,7 \end{array} \right\} 73,7$
$\frac{1}{10}$ cultuur, 24 uur, 1 \times .	25 : 18	72	28
$\frac{1}{10}$ cultuur, 48 uur, 3 \times .	25 : 3	12	86
$\frac{1}{1000}$ cultuur, 24 uur, 1 \times .	25 : 20	80	20
$\frac{1}{1000}$ cultuur, 48 uur, 3 \times .	25 : 11	44	56
Ascites, sereus, $\frac{1}{10}$	10 : 3	30	70
Ascites, sereus, $\frac{1}{3}$	$\left. \begin{array}{l} 20 : 0 \\ 12 : 2 \end{array} \right\} 24 : 2$	$\left. \begin{array}{l} 0 \\ 16,6 \end{array} \right\} 8,3$	$\left. \begin{array}{l} 100 \\ 83,4 \end{array} \right\} 91,7$
Ascites, etterig, $\frac{1}{10}$	10 : 0	0	100
De uitslag van de pulmonale infecties.			

Men ziet hieruit het volgende: van de muizen, die met een 24 uur-oude geheele cultuur (type 1) pulmonaal geïnfecteerd zijn, sterven gemiddeld van 5 proeven 73.7%. Bij 26.3% van de dieren krijgt men dus òf geen infectie, òf genezing. Bij gebruik van een op $\frac{1}{10}$ verdunde 24 uur-oude cultuur bleven evenwel reeds 72% van de dieren in leven en van de met de verdunning $\frac{1}{1000}$ geïnfecteerde muizen zelfs 80%. Veel gunstiger werd het resultaat van de infectie, wanneer een pneumococcencultuur gebruikt werd, die 24 uur op 37° en vervolgens 24 uur op kamertemperatuur gehouden was en wanneer hiermede niet één keer, maar drie keer, met telkens een tussenpoos van één uur, geïnfecteerd werd. Hier bleven van de met de verdunning $\frac{1}{10}$ geïnfecteerde muizen slechts 12% en van

de met de verdunning 1/1000 geïnfekteerde muizen slechts 44% in leven. Op deze manier kon het aantal der dieren, die aan pneumonieën stierven, verhoogd worden.

Verder zijn in de tabel drie proeven weergegeven, waarbij de pulmonale infectie niet met cultuurmateriaal, maar met pneumococcen uit het muizenlichaam werd verricht. Deze lichaamskiemen werden verkregen door een met ascitescarcinoom intraperitoneaal geënte muis op het hoogtestadium der ziekte intraperitoneaal met pneumococcen te infecteren. Na 24 uur kon men dan uit de gestorven muis gemakkelijk 5—10 ccm pneumococcenhoudende ascites nemen. Dit materiaal werd voor de laatste proeven steeds gebruikt. Ascites alleen veroorzaakt geen pneumonie, in enkele gevallen echter ontstaat carcinoma-teuze ascites in de borstholte. Bij gebruik van de pneumococcenhoudende ascites bleven in één geval van de met sereuze ascites in de verdunning 1 : 10 geïnfekteerde muizen 30% in leven, in twee andere proeven bleven van de met sereuze ascites in de verdunning 1 : 3 geïnfekteerde dieren 0, resp. 16.6% in leven en in de laatste proef bleef van de met etterige ascites 1 : 10 pulmonaal geïnfekteerde muizen geen enkele in leven.

Overziet men deze proeven, dan blijkt hieruit wel tamelijk duidelijk, dat de long van de muis inderdaad een zeer krachtig afweermecanisme tegen pneumococceninfectie moet hebben. Reeds bij de verdunning van een cultuur tot 1/10, blijft meer dan de helft van de geïnfekteerde dieren in leven en eerst door de snel op elkaar volgende infecties wordt het aantal van de aan pneumonie lijdende muizen groter. Verder echter schijnt men uit de protocollen te mogen besluiten, dat „lichaamskiemen” gemiddeld meer dieren aan pneumonie doen ziek worden, dan cultuurkiemen. De oorzaken van dit verschijnsel worden nog nagegaan.

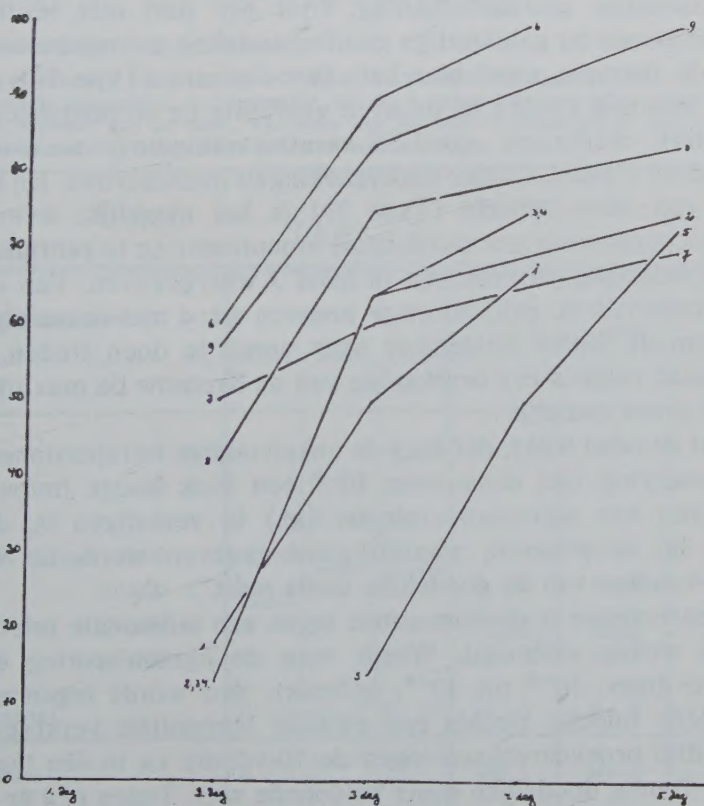
Het is misschien interessant, ook een overzicht van de levensduur van aan pneumonie lijdende muizen te geven. In *tabel 2* is daarom van de proeven met de geheele cultuur en met ascites aangegeven, wanneer elk van de dieren gestorven is. Men ziet hieruit, dat het meerendeel van de met cultuur geïnfekteerde dieren op den 3den dag na de infectie gestorven is, van de met ascites geïnfekteerde dieren echter reeds op den 2den dag. Geen enkel dier echter, en dit zij reeds hier met nadruk vastgesteld, is al op den 1sten dag gestorven. De ster-

TABEL 2.

Infectie:		Cultuur					Ascites			
Proef:		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Gestorven	1. dag									
	2. dag	1	1	1	1		6	5	5	7
	3. dag	2	4	4	4	1	3	1	4	3
	4. dag	1		1	1	3	1			1
	5. dag		1			2		1	1	1
Blijft leven		2	2	2	2	2	0	3	2	0
Totaal		6	8	8	8	8	10	10	12	12

Levensduur van de contrôles na pulmonale infectie.

FIGUUR 1.



Levensduur van pulmonaal geïnfecteerde muizen.

kere werkzaamheid van de ascites blijkt ook uit deze tabel. Nog duidelijker worden deze verhoudingen, als men de getallen grafisch vastlegt, ofschoon een berekening in procenten eigenlijk bij deze kleine getallen niet geoorloofd zou zijn. Desondanks zijn de waarden in *figuur 1* weergegeven.

Het hier zeer duidelijke weerstandsvermogen van de longen moet men bij de hieronder volgende beschrijving van elk van de proeven voor oogen houden, om bij de resultaten van de pulmonale infectie van geïmmuniseerde dieren niet tot foutieve conclusies te komen en een al te groot immuniseeringseffect er uit te lezen.

Immunitet na intraperitoneale immuniseering.

In verschillende proeven werden muizen intraperitoneaal met bij 100° gedood materiaal, voor een deel met zulk materiaal bij gelijktijdige goudbehandeling, voor een deel met levende pneumococcen bij gelijktijdige goudbehandeling geïmmuniseerd. Voor de therapie werd hier het *Auro-Detoxin* (Type 70) gebruikt, een nog slechts bij proeven gebruikte en op pneumococcen sterk werkzame goud-SS-keratineverbinding, waarover *Neufeld* en *Collier, Collier* onderzoekingen publiceerden. Bij gebruik van *Auro-Detoxin* (Type 70) is het mogelijk, levende pneumococcen voor intraperitoneale immuniseering te gebruiken. De afzonderlijke proeven zijn in *tabel 3* weergegeven. Van een combinatie van de gelijksoortige proeven werd met opzet afgezien, om de fouten duidelijker naar voren te doen treden, te meer daar volgens een berekening van de Kromme de maximale fout te groot zou zijn.

Uit de tabel blijkt, dat door de enkelvoudige intraperitoneale immuniseering met dosen van 10^{-5} een flink hoge immunitet tegen een algemeene infectie (ip.) te verkrijgen is, die, vooral bij de proeven, waarbij goud gegeven werd, tot het 10.000-voudige van de dodelijke dosis reikt.

Daarentegen is de immunitet tegen een pulmonale infectie slechts weinig verhoogd. Wordt voor de immuniseering een kleinere dosis, 10^{-6} tot 10^{-9} , gebruikt, dan wordt tegen een algemeene infectie slechts een zwakke immunitet verkregen, die in drie proevenreeksen tegen de 10-voudig en in één tegen de 100-voudig dodelijke dosis voldoende was. Tegen een er op volgende pulmonale infectie ontstaat echter hier geen noemens-

TABEL 3.

Geïmmuniseerd :	100 ⁰		100 ⁰ + goud	Levend + goud						
Proef	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Immun. dosis	10-5	10-5	10-5	10-5	10-5	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
1 × .	3:3			5:5						
10 × .	<u>3:3</u>			5:5			<u>2:2</u>	<u>2:1</u>	<u>2:2</u>	2:2
Bescherm. ip. tegen: 100 × .	3:0	4:4	4:4	<u>4:2</u>	4:4		2:0	2:0	2:0	<u>2:2</u>
1000 × .		<u>4:3</u>	4:4		4:4		2:0	2:0	2:0	2:0
10.000 × .		<u>4:1</u>	<u>4:4</u>		<u>4:3</u>					
100.000 × .		4:0	4:2		4:0					
Pulmonaal	6:2	4:3	4:2	6:3	4:2	4:2	11:1	9:2	10:1	9:5
Contrôles	6:2	8:2	als 2	als 1	als 2	10:0 A.	12:0 A.	als 7 A.	als 7 A.	als 7 A.

Enkelvoudige ip. immunisering.

De bescherming tegen de ip. infectie is als bescherming tegen 1×, 10× enz. van de dosis letalis aangegeven. 3:3 betekent, dat van 3 muizen 3 in leven blijven. Onderstreept is het veelvoud van de dosis, waartegen nog duidelijk de immuniteit te zien is. Bij de pulmonale contrôles beteekent A = Ascites voor de infectie.

TABEL 4.

Geïmmuniseerd:	100 ⁰ 3 ×			100 ⁰ 3 × + goud	Levend 3 × + goud	100 ⁰ 3 × + levend 1 ×
Proef	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1 × .			3:3			
10 × .		2:2	3:3			
100 × .		2:2	4:4			
Bescherm. ip. tegen: 1000 × .	4:2	2:2	4:2	4:4	4:4	
10.000 × .	4:3			4:3	4:4	
100.000 × .	4:1			4:2	4:3	
1.000.000 × .	4:0			4:1	4:1	
Pulmonaal	6:5	9:7	20:20	6:5	6:6	11:10
Contrôles	8:2	10:0 A.	10:3 A.	als 1	als 1	12:0 A.

Meervoudige ip. immunisering.

waardige immuniteit. Alleen in de laatste proef met de kleinste immuniseeringsdosis bleven 5 van 9 muizen in leven, maar hier was, vreemd genoeg, ook de immuniteit tegen een algemeene infectie zeer hoog.

Verder werden muizen herhaaldelijk, deels met levende, deels met doode pneumococcen intraperitoneaal geïmmuniseerd, waarbij ook weer enkele groepen met goud behandeld werden. Deze proeven zijn in *tabel 4* weergegeven. Over het geheel genomen ziet men hieruit, dat één maal de bescherming tegen een algemeene infectie door de meervoudige immuniseering verhoogd is. Verder komt ook hier tot uiting, dat de gelijktijdige goudbehandeling de immuniteit verhoogt, want er is hier een bescherming zelfs tegen de 100.000-voudig dodelijke dosis. Totaal in tegenstelling tot de boven beschreven vondsten bij enkelvoudige immuniseering, blijkt echter verder, dat door de meervoudige intraperitoneale immuniseering een zeer hoge bescherming, ook tegen de pulmonale infectie tot stand werd gebracht. Met uitzondering van 5 dieren bleven alle 58 pulmonaal geïnfecteerde muizen in leven! Door een meervoudige intraperitoneale immuniseering kan dus niet alleen een zeer hoge bescherming tegen een er op volgende algemeene infectie, maar ook tegen een pulmonale infectie bereikt worden.

Immuniteit na pulmonale immuniseering.

In verschillende proeven werden muizen één maal pulmonaal met doode of levende pneumococcen en wel deels zonder, deels met gelijktijdige goudbehandeling, geïmmuniseerd. Deze proeven zijn in *tabel 5* weergegeven.

Allereerst valt het hier op, dat bij één maal gebruik van gedoode ziekteverwekkers de immuniteit tegen een algemeene infectie zeer gering is; zij reikt tot aan de 10-voudig dodelijke dosis en wel is het hierbij van geen belang, of $1/3$, $1/10$ of $1/1000$ cultuurverdunding ter immuniseering gebruikt wordt. Beter is, bij gebruik van $1/3$ cultuurverdunding, de immuniseering tegen een er op volgende *pulmonale* infectie; bij de kleinere immuniseeringsdoses van $1/10$ en $1/1000$ komt er echter in het geheel geen immuniteit tot stand. In de beide proeven, waarbij de immuniseering met gedoode kiemen aan goudbehandeling gekoppeld werd, is de bescherming tegen een algemeene infectie iets beter; zij reikt tot de 100-, resp. 1000-voudig doode-

TABEL 5.

Geïmmuniseerd:	100 ^o				100 ^o + goud		levend + goud					levend				
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
Proef	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{11000}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{1000}$
Immun. dosis . .																
1 × .		3:2				3:2	5:4		3:3	1:1	2:2					
10 × .	<u>3:3</u>	<u>3:2</u>	<u>3:2</u>	<u>3:3</u>	3:2	3:3	5:2	3:3	3:3	<u>1:1</u>	<u>2:2</u>				2:2	<u>2:2</u>
bescherm. 100 ×	3:1	3:1	3:0	3:1	3:2	<u>3:3</u>	<u>5:3</u>	3:2	3:2	1:0	2:0	<u>2:2</u>			<u>2:2</u>	2:0
ip. tegen:	3:1	3:1	3:0	3:0	<u>3:2</u>	3:1		<u>3:2</u>	<u>3:2</u>	1:0	2:0	2:0			2:0	2:0
1000 × .					3:0			3:0								
10.000 × .	3:0															
Pulmonaal	4:3	9:7	13:2	15:1	4:3	7:6	5:3	5:3	7:6	10:9	8:4		4:1	8:6	11:2	12:2
Contrôles	8:2	8:2	12:2 A.	als 3 A.	als 1	als 2	6:2	als 1	als 2	10:0 A.	als 10 A.		als 10 A.	als 10 A.	als 3 A.	als 3 A.

Enkelvoudige pulmonale immunisatie.

lijke dosis; ook is in dit geval de bescherming tegen een pulmonale infectie duidelijk, evenals na één maal immuniseeren met levende pneumococcen bij gelijktijdige goudbehandeling. Hier wordt bij gebruik van de geheele cultuur een bescherming tegen de 10-voudig tot 1000-voudig doodelijke dosis bij algemeene infectie bereikt; maar ook de bescherming tegen een pulmonale infectie is duidelijk. Bij het gebruik van levende kiemen alleen bleek bij de verdunning 1 : 3 een immuniteit tegen de 100-voudig doodelijke dosis bij algemeene infectie te bestaan; in twee volgende proeven bleek de immuniteit tegen pulmonale infectie één keer sterk en één keer zwak te zijn. De immuniseeringsdosis van slechts 1/10 gaf eveneens nog tegen de 100-voudig doodelijke dosis van de algemeene infectie, de dosis 1/1000 echter nog slechts tegen de 10-voudig doodelijke dosis een bescherming. In beide gevallen was tegen een er op volgende pulmonale infectie geen bescherming aanwezig.

In drie kleinere proeven werd de pulmonale immuniseering twee maal uitgevoerd, de proeven vindt men in de *tabel 6* weergegeven. De uitkomsten onderscheiden zich weinig van die waar één maal geïmmuniseerd werd.

TABEL 6.

Geïmmuniseerd	1 × levend + goud, 1 × levend		levend 2 ×
Proef	1.	2.	3.
10 × .			2 : 2
Bescherm. ip. tegen: 100 × .	<u>2 : 2</u>		2 : 2
1000 × .	5 : 1	<u>2 : 1</u>	<u>2 : 1</u>
Pulmonaal	2 : 2	2 : 2	
Contrôles	12 : 2 A.	als 1 A.	
Tweevoudige pulmonale immuniseering.			

In verscheidene proeven werd de pulmonale immuniseering drie maal uitgevoerd. De proeven vindt men in *tabel 7* weergegeven. Ook hier weer bleek, dat bij gebruik van levende kiemen, hetzij met, hetzij zonder goudbehandeling, een betere algemeene immuniteit bereikt werd dan bij gebruik van doode.

TABEL 7.

Geïmmuniseerd		100 ⁰				Levend + goud	Levend	
Proef		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Immun. dosis		1/3	1/3	1/10	1/1000	1/1	1/10	1/1000
	1 × .	1 : 1				3 : 2		
Bescherm.	10 × .	1 : 1	<u>2 : 2</u>	<u>2 : 2</u>	<u>2 : 2</u>	3 : 3		
ip. tegen:	100 × .	<u>1 : 1</u>	2 : 0	3 : 0	3 : 0	3 : 3		2 : 1
	1000 × .		2 : 0	3 : 0	3 : 0	<u>3 : 3</u>		<u>2 : 1</u>
Pulmonaal		9 : 6	8 : 4	14 : 3	13 : 3	5 : 5	3 : 3	7 : 3
Contrôles		10 : 0 A.	10 : 3 A.	12 : 2 A.	als 3 A.	8 : 2	als 3 A.	als 3 A.

Drievoudige pulmonale immunisering.

De immuniteit tegen de algemeene infectie reikte tot de 1000-voudig, resp. tot de 10-voudig en tot 100-voudig dodelijke dosis. Hier is het bijzonder interessant, dat bij gebruik van gedooide kiemen, zoowel bij de immuniseeringsdosis 1/3, 1/10 als ook 1/1000, dezelfde algemeene immuniteit bereikt werd, die evenwel niet zeer hoog is. Voor een er op volgende pulmonale infectie was echter de immuniseeringsdosis 1/3 gunstiger dan de beide kleinere dosen.

Tenslotte vindt men in de *tabel 8* twee proeven met vier-

TABEL 8.

Geïmmuniseerd		100 ⁰ 3 ×, Levend 1 ×	
Proef.		1.	2.
Bescherm.	100 × .	<u>2 : 2</u>	<u>2 : 2</u>
ip. tegen	1000 × .	2 : 0	2 : 0
Pulmonaal		1 : 0	
Contrôles		12 : 2 A.	

Viervoudige pulmonale immunisering.

maal verrichte pulmonale immunisatie. Ook hier was de immuniteit tegen de algemeene infectie klein.

Uit al deze proeven met pulmonale immunisatie blijkt, dat de algemeene immuniteit, die op deze wijze bereikt werd, niet zeer hoog is, ook niet na herhaalde immunisatie. De immuniteit tegen pulmonale infectie wordt ook wel verhoogd; het schijnt echter van geen belang te zijn, of één maal dan wel meermalen geïmmuniseerd wordt. Dit is temeer opvallend, waar door herhaalde intraperitoneale immunisatie een betere bescherming bereikt wordt, dan indien één maal geïmmuniseerd wordt. Het komt dus door herhaalde pulmonale immunisatie niet tot die immuniteitsverhoging als bij herhaalde intraperitoneale immunisatie.

Voor de verklaring van deze geringere immuniteit mag men misschien aannemen, dat het bij de pulmonale immunisatie, zoowel tot het verwekken van een algemeene immuniteit komt, als ook, dat door het inbrengen van antigeen in de longen een beschadiging van dit orgaan tot stand komt. In den regel zal de verhoogde immuniteit de verzwakking van de long opheffen

TABEL 9.

Geïmmuniseerd	$\frac{1 \times \text{ip.} + 1 \times \text{pulmonaal}}$	$3 \times \text{ip.} + 1 \times \text{pulmonaal}$	
Proef:	1.	2.	3.
10 × .			3 3
beschermt. ip. tegen: 100 × .		2:2	3:3
1000 × .	2:0	<u>3:2</u>	<u>3:2</u>
Pulmonaal		2:1	11:10
Contrôles		2:2 A.	12:0 A.
Gecombineerde immunisatie.			

en zelfs overwegen, maar slechts tot een bepaalden graad. Er mag hier wel gewezen worden op de verhoudingen bij den mensch, waar na het doorstaan van een pneumonie, de long voor opnieuw ziek worden als het ware voorbeschikt schijnt te zijn. In deze richting wijzen ook de resultaten na pulmonale immu-

niseering met kleine, ontoereikende doses, waardoor slechts een zwakke algemeene immuniteit, maar geen immuniteit tegen een er op volgende pulmonale infectie bereikt wordt. Dit zal nader besproken worden.

Volledigheidshalve staan in *tabel 9* eenige proeven van een gecombineerde immuniseering aangegeven, die echter niets bijzonders toonen, maar aan de intraperitoneale immuniseering gelijk te stellen zijn.

De werking van zwakkere pulmonale immuniseering.

Er dient op een verschijnsel te worden ingegaan, dat zich bij de muizen vertoonde, die met kleine doses pulmonaal geïmmuniseerd en dan pulmonaal geïnfecteerd werden. In den aanvang werd er op gewezen, dat van de pulmonaal geïnfecteerde normale muizen geen enkele reeds op den eersten dag na de infectie gestorven was. Van de pulmonaal zwak geïmmuniseerde dieren, die in *tabel 6* (proef 3, 4, 15, 16) en *tabel 8* (proef 3, 4, 6, 7) aangegeven staan, stierf intusschen een zeker aantal reeds op den *eersten* dag na de pulmonale infectie onder het beeld van een sterk haemorrhagische pneumonie. Dr. v.

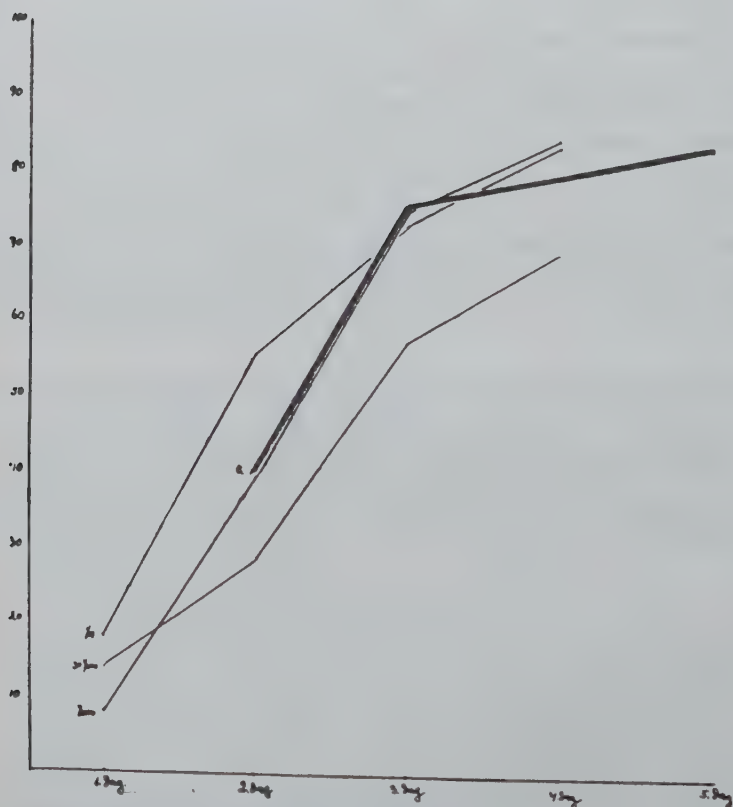
TABEL 10.

Geïmmuniseerd:	1 ×				3 ×				—
	levend		100 ⁰		levend		100 ⁰		—
	10-1	10-3	10-1	10-3	10-1	10-3	10-1	10-3	Contrôles
1. dag .	2	1	5	7		1	2	1	
2. dag .	4	4	3	6		1	2	4	5
gestorven: 3. dag .	2	4	3	1		2	5	4	4
4. dag .	1	1					2	1	
5. dag .									1
Blijft leven	2	2	2	1	3	3	3	3	2
Totaal . . .	11	12	13	15	3	7	14	13	12

Levensduur van pulmonaal zwak geïmmuniseerde muizen na pulmonale infectie.

d. Schaaf was zoo vriendelijk deze diagnose histologisch te bevestigen. De longen lagen bij de dieren ingebed in groote hoeveelheden geronnen bloed, dat de borstholte geheel opvulde. In de *tabel 10* is de levensduur van deze muizen aangegeven. Het gaat voornamelijk om dieren, die één maal met gedood materiaal en wel in het bijzonder om zulke, die met de kleinste dosis (10^{-8}) geïmmuniseerd waren. Voor de duidelijkheid werden deze waarden nog eens in de grafische voorstellingen *figuur 2* en *figuur 3* aangegeven. Bij deze dieren is het zonder twijfel tot

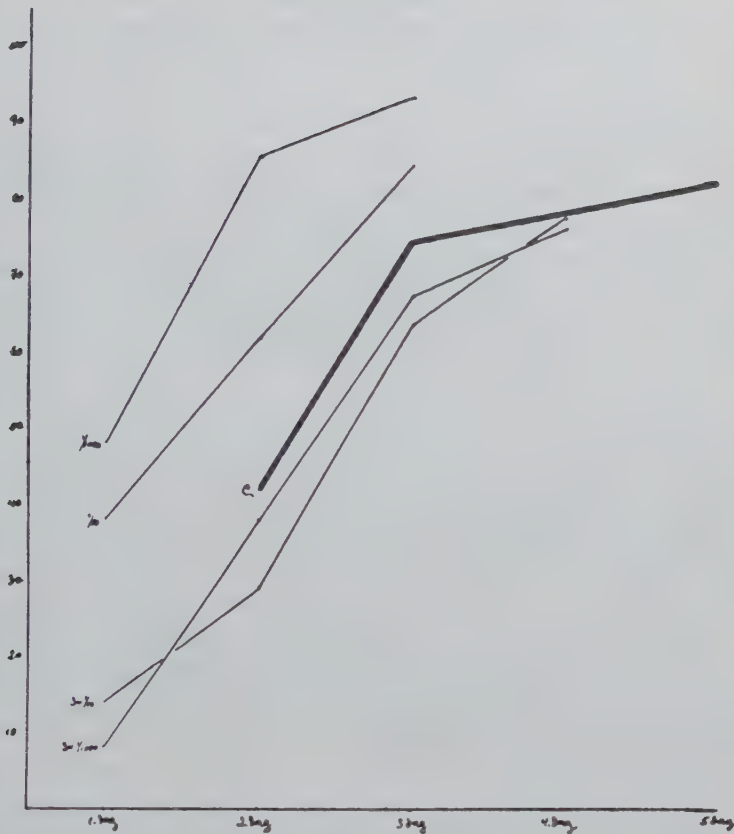
FIGUUR 2.



Levensduur van de pulmonaal levend zwak geïmmuniseerde muizen na pulmonale infectie.

een versnelden afloop van het longproces met bijzonder uitgesproken ontstekingsverschijnselen gekomen. Men mag hier wel aan een soort overgevoeligheid denken, waardoor het proces

FIGUUR 3.



Levensduur van de pulmonaal zwak (100%) geïmmuniseerde muizen na pulmonale infectie.

versneld en versterkt is. In de richting van een dergelijke overgevoeligheid wijzen ook de in den aanvang geciteerde vondsten van *Stillman* en *Branch*, die eerst na herhaalde inhalatie van levende of doode pneumococcen bij hernieuwde inhalatie bij de muis typische lobaire pneumoniën zagen optreden. Volgens *Neufeld* en *Collier* vertoonen normale muizen 20—22 uur na de pulmonale infectie wel reeds kleine en gedeeltelijk ook uitgebreide haarden in de longen, zij sterven echter nog niet daaraan. Bij de bovenstaande proeven echter is het tot een versneling en verergering van het pneumonisch proces gekomen en wel bij dieren, die na de pulmonale immunisatie met kleine doses geen immuniteit tegen een pulmonale infectie verkregen

hadden. Of bij dit verschijnsel misschien de negatieve phase van belang is, moet nog verder onderzocht worden.

Samenvatting.

Bij de pulmonale infectie van de muis met cultuurpneumococci type 1 blijven in de beschreven proeven bij gebruik van onverdunde cultuur 26.3% van de dieren in leven, bij 1/10 verdunning 72% en bij 1/1000 verdunning zelfs 80%. Door driedovoudige infectie met tussenpoozen van elk één uur wordt het getal van de aan pneumonie lijdende dieren aanmerkelijk verhoogd.

Bij enkelvoudige intraperitoneale immunisering met sterke concentraties (10^{-5}) komt het tot het ontstaan van een hoge immuniteit tegen algemeene infectie (ip. infectie), daarentegen slechts tot een geringe bescherming tegen een pulmonale infectie. Na de immunisering met kleine doses (10^{-6} tot 10^{-9}) is de bescherming tegen een algemeene infectie belangrijk geringer, tegen een pulmonale infectie echter minimaal.

Door meervoudige intraperitoneale immunisering verkrijgt men niet alleen een bijzonder hoge bescherming tegen een er op volgende intraperitoneale, maar ook een zeer hoge bescherming tegen een pulmonale infectie.

Door enkelvoudige pulmonale immunisering ontstaat tegen een algemeene infectie een geringere bescherming, dan na intraperitoneale immunisering. Tegen pulmonale infectie geeft enkelvoudige pulmonale immunisering alleen bij hoge dosering een bescherming, want al bij 1/10 cultuurverdunding is geen bescherming meer aan te toonen.

Herhaalde pulmonale immunisering overtreft nauwelijks de enkelvoudige, wat betreft de bescherming tegen er op volgende intraperitoneale of pulmonale infectie.

Bij de pulmonale immunisering ontstaat een algemeene immuniteit; door het inbrengen van antigeen in de long schijnt het echter ook tot een beschadiging van dit orgaan te komen.

Onvolledig pulmonaal geïmmuniseerde muizen toonen tegen een pulmonale infectie geen immuniteit, zij sterven integendeel voor een deel aan sneller verlopende en uitgebreider pneumoniën dan de contrôledieren.

LITERATUUR.

- Besnoit, Leclainche u. Morel*, Zit. nach *Kraus-Levaditi*, Handbuch, Ergänzungsband 1, pg. 334.
- Bieling*, zit. nach *Kolle-Krauss-Uhlenhuth*, Handbuch II, pg. 170. 1929.
- Blake & Cecil*, Journ. exp. Med. 31. 403. 445. 499. 1920.
- Blumenthal*, Berl. klin. Wochenschr. 45. 1229. 1908.
- Cecil & Steffen*, Journ. exp. Med. 34. 245. 1921; 38. 149. 1923; Bull. Hyg. Laborat. Washington 4. 1. 1925; 5. 19. 1926.
- Collier*, Z. f. Imm.forsch. 85. 287. 1935; Z. f. Hyg. 117. 470. 1935.
- Kaneko*, Z. f. Imm.forsch. 34. 424. 1922.
- Lange*, Z. f. Hyg. 102. 224. 1924.
- Neufeld & Collier*, Z. f. Hyg. 117. 129. 1935.
- Neufeld & Ettinger-Tulczynska*, Z. f. Hyg. 112. 492. 1931.
- Neufeld & Kuhn*, Z. f. Hyg. 116. 697. 1935.
- Pfenniger*, Ann. Inst. Pasteur 35. 237. 1921.
- Russel & Steffen*, Hyg. Laborat. Washington Bull. 141. 1925.
- Scheweleff*, Dissertation d. Militärmed. Akad. St. Petersburg 1910, ref. in Z. f. Imm.forsch. Teil II, 3, p. 1085.
- Shope*, Journ. exp. Med. 60, 564. 1934.
- Stillman*, Journ. exp. Med. 40. 564. 1924.
- Stillman & Branch*, Journ. exp. Med. 40. 733. 1924.
-

Bacterium Pneumoniae en Bacterium Lactis Aerogenes

DOOR

Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF

In het algemeen is men het gevoelen toegedaan, dat men in het *Bacterium pneumoniae* en in het *Bacterium lactis aerogenes* zeer naverwante soorten te zien heeft, zelfs zó verwant, dat velen deze beide microben voor identiek houden.

Het is op grond van overeenkomst in morphologische en cultuur-eigenschappen, dat men ertoe gebracht werd het door *Friedländer* in 1882 beschreven organisme, waarin hij de oorzaak van de croupeuze of fibrineuse pneumonie meende te moeten zien, als een lid van de zogenaamde Coligroep te beschouwen.

Men heeft in het *Bacterium pneumoniae* een polymorph, asporogeen, onbewegelijk, gram-negatief, facultatief anaëroob en aan de uiteinden afgerond staafje voor zich, dat gelatine niet tot vervloeien brengt. Het is vooral bekend en gekenmerkt, doordat het in een geschikte omgeving tot het vormen van een duidelijk ontwikkelde kapsel overgaat. Deze eigenschap verklaart tevens de neiging tot slijmvorming, welke men bij de kolonie kan waarnemen, indien een uitgesproken S-vorm aanwezig is.

De staafjes zijn doorgaans kort en plomp, soms zijn ze tot korte ketens gerangschikt, zodat hier niet slechts van een kapsel-, maar bovendien van een strepto-bacterium kan worden gesproken. De polymorphie uit zich, doordat het organisme, behalve de normale staafvorm, tevens die van coccoïde of die van een kortere of langere draad kan aannemen.

Evenals de overige Coli-achtigen is deze bacterie zeer

weinig kieskeurig, zodat een overvloedige ontwikkeling en groei op de gebruikelijke voedingsbodems plaats vindt, waarbij op vloeibare media zelfs zoöglöea kunnen ontstaan.

Het was *Grimbert*, die in samenwerking met *Legros*, in 1900, als zijn mening uitsprak, dat het organisme identiek is met *Bacterium lactis aerogenes*, waarbij hij zich voornamelijk beriep op de overeenkomst in biologische eigenschappen.

De belangrijkste, biochemische kenmerken mogen in het kort vermeld zijn.

In peptonwater wordt geen indol gevormd, gelatine wordt niet vervloeid, glucose, fructose, saccharose, maltose, benevens manniet worden ontleed, in de regel onder de vorming van zuur en gas, soms slechts onder zuurvorming alleen.

Grimbert zegt, dat uit de monosacchariden 1-melkzuur ontstaat, terwijl uit de disacchariden bovendien barnsteenzuur zich vormt. Daar hij een dergelijk gedrag bij *Bacterium lactis aerogenes* opmerkte, besluit hij tot de gelijkheid dezer organismen. Daarenboven wijst hij op de overeenkomst in kapselvorming en op die in pathogeniteit ten opzichte van proefdieren.

Reeds hij wijst erop, dat men drie verschillende types van *B. pneumoniae* heeft te aanvaarden, nml. één, dat uit dulciet zuur en gas vormt, één, dat deze eigenschap mist, maar welke beide overeenkomen, doordat ze in staat zijn glycerine te vergisten, en ten slotte één, dat noch dulciet, noch glycerine aantast.

Het valt zeker niet te ontkennen, dat *B. pneumoniae* en *B. lactis aerogenes* een zeer treffende en grote overeenkomst vertonen, maar toch, ondanks dit niet te ontkennen feit, wordt een identiteit niet door allen aanvaard. Deze onzekerheid bracht mij er toe een uitvoerig onderzoek naar de biochemische eigenschappen van het *B. pneumoniae* in te stellen, omdat het daardoor wellicht mogelijk zou worden hier enig licht te ontsteken.

Er stonden mij 26 verschillende stammen van onder de naam *B. pneumoniae* ingeschreven organismen ter beschikking, welke uit verschillende laboratoria hier te lande, zowel als uit het Institut Pasteur te Parijs, als uit het Lister Institute te Londen afkomstig waren, terwijl hieraan bovendien enige te Utrecht geïsoleerde stammen konden worden toegevoegd.

Enkele dezer stammen waren in S-, alsmede in R-vorm aanwezig.

Alle in het onderzoek betrokken organismen voldeden aan de reeds vermelde, morphologische kenmerken, terwijl zij geen indol deden ontstaan en geen gelatine tot vervloeijing brachten.

In de allereerste plaats meende ik juist te handelen, door de stammen met behulp van de reactie van *Voges-Proskauer* te onderzoeken, omdat deze, naar het mij wil voorkomen, van zeer grote, diagnostische betekenis is voor de herkenning van het aerogenes-type. Het zuivere type toch doet methylacetylcarbinol bij de ontleding van suikers ontstaan, terwijl tevens de methylroodreactie daarbij negatief verloopt.

Het is bovendien bekend, dat *Koser* de groei in citraat, resp. mede in urinezuur, betreft bij het stellen van het onderscheid tussen coli- en aerogenes-bacteriën.

Het was dus eveneens van belang, kon het althans zijn, indien ook deze voedingsbodems in onderzoek werden genomen, te meer, omdat mij geen mededelingen dienaangaande bekend zijn.

Met betrekking tot de reactie van *Voges* en *Proskauer* moge worden opgemerkt, dat *Small* en *Julianelle*, in 1923, geen parallellisme van de positieve carbinol- en de negatieve methylroodproef bij *B. pneumoniae* konden opmerken.

De volgende *meerwaardige alcoholen* werden in het onderzoek betrokken:

Glycerine, erythriet, adoniet, sorbiet, manniet en dulciet.

De onderstaande *monosacchariden*:

Arabinose, xylose en rhamnose, als pentosen; Glucose, fructose, mannose en galactose, als hexosen.

Van de *disacchariden*: maltose en lactose van de maltosegroep, saccharose en trehalose van de trehalosegroep.

De *trisacchariden* moesten beperkt worden tot raffinose.

Ten slotte werden de organismen, altans ten dele, aan de proef van Eijkman onderworpen.

In het algemeen kan worden gezegd, dat de onderzochte organismen pathogeen voor de muis waren.

Reeds aanstonds bleek, dat men twee zeer verschillende types van *B. pneumoniae* heeft te onderscheiden en wel het type, dat een positieve en dat, hetwelk een negatieve reactie van *Voges* en *Proskauer* doet vinden.

Hoewel veelal een positieve V.P. samengaat met een negatieve methylroodreactie, en omgekeerd, werd een hoogst enkele

maal dat antagonisme niet opgemerkt en ging een positieve V.P. gepaard met een eveneens positieve M.R.

Indien men aan de methylroodreactie, als zijnde feitelijk een meer quantitatief onderscheid, niet te grote waarde wenst toegekend te zien, dan blijft dus in hoge mate het eigenaardig verschil ten opzichte van de V.P.-reactie de aandacht trekken, omdat daarmee de indentiteit van pneumoniae en aerogenes, altans in bepaalde gevallen, zeker niet tot uiting wordt gebracht! Van de 26 verschillende stammen bleken 19 V.P.-positief, terwijl 7 V.P.-negatief zich verhielden, deze laatsten kunnen dus zeker geen aerogenestype zijn.

De thermotolerantie, ten opzichte van de vergisting van glucose bij 45°, de zogenaamde proef van *Eijkman*, bleek eveneens twee types aan te wijzen, waarvan één zich als negatief-, het ander zich als positief-thermotolerant deed kennen. Het bleek verder, dat het eerste samenviel met een negatieve, het tweede met een positieve V.P.-reactie.

De urinezuurproef van *Koser* gaf een volkomen analoog beeld met zijn citraat-proef te zien; ook hier weder waren positief en negatief zich gedragende types te vinden.

Reeds hieruit mag worden besloten, dat onder de naam *B. pneumoniae* verschillende soorten schuil gaan, het dus zeker niet opgaat het organisme zonder meer met *B. lactis aerogenes* te identificeren.

Grimbert heeft dus in zijn algemene uitspraak zeker geen gelijk, maar wel blijft de mogelijkheid bestaan, dat er onder de naam pneumoniae, tevens aerogenes begrepen is en dat hij bij zijn onderzoek een dergelijk type voor zich heeft gehad.

Gaan wij tans de biochemische eigenschappen van *B. pneumoniae* na, dan kan het volgende worden opgemerkt:

Afgezien van de mogelijkheid, dat onder deze benaming verschillende types worden samengevat, kan worden gezegd, dat dit micro-organisme steeds in staat is de volgende suikers, resp. suikerachtige stoffen, aan te grijpen, veelal onder gelijktijdige vorming van zuur en gas, soms slechts alleen zuur. Steeds worden ontleed,

Hexieten: sorbiet en manniet.

Pentosen: arabinose, xylose en rhamnose.

Hexosen: glucose, fructose, mannose en galactose.

Disacchariden: maltose, trehalose en saccharose.

Trisacchariden: raffinose.

Glucosiden: salicine.

Hieruit volgt, dat de onderstaande verbindingen *niet steeds* door de verschillende vertegenwoordigers van de pneumoniae-groep worden aangegrepen,

Meerwaardige alcoholen: glycerine, adoniet en dulciet.

Disacchariden: lactose.

Als een algemene eigenschap kan ook nog genoemd zijn, dat geen der door mij onderzochte stammen ooit erythriet heeft ontleed.

Indien men dus, in verband met de wisselende gedragingen, tot een groepering van de pneumoniae-groep zou willen besluiten, dan bieden de genoemde verbindingen, glycerine, adoniet, dulciet en lactose, daartoe de gelegenheid.

Na deze algemene beschouwingen, wensen wij de verkregen gegevens, met elkander in nader verband gebracht, te rangschikken, om te trachten, of het, op grond hiervan, mogelijk is een rationele onderverdeling van het als *Bacterium pneumoniae* te boek staand organisme op te stellen.

Bij de V.P.-positieve types laten de beide combinaties V.P.-pos. en citr.-pos., V.P.-pos. en citr.-neg. zich zeer duidelijk onderscheiden.

Het V.P.-negatieve type staat geheel geïsoleerd, combineert dit negatieve met een positief verloop der citraatproef.

Indien er dus van een aerogenes-type bij het *B.-pneumoniae* mag worden gesproken, zal men dit in dié stammen hebben te zoeken, welke een V.P.-pos.- met een citraat-pos.-zijn vertonen.

Volledigheidshalve kan hieraan nog worden toegevoegd, dat, voor zover daarop onderzocht, dit type tevens een positieve urinezuur en een negatieve methylroodreactie vertoonde, echter wij vonden ook soms een positieve carbinol- met een eveneens positieve methylrood-reactie samengaan.

Wijst dit alles erop, dat men hier het aerogenestype voor zich heeft, dit is zeker niet het geval, waar men een V.P.-positief- ziet gecombineerd met een citraat-negatief-zijn, even min, indien een V.P.-negatief wordt gevonden, dat met een citraat-positief verbonden wordt.

Hierin heeft men, naar mijn mening, een bijzondere soort te zien, welke zich, op grond van deze beide combina-

ties, als het ware tussen het coli- en het aerogenes-type inschuift, waarvan immers het eerste type de twee bedoelde reacties negatief, het laatste, positief laat verlopen.

Deze species laat zich echter tot twee verschillende types, vormen of onderspecies brengen, zoals uit de vermelde eigenschappen gemakkelijk is af te leiden.

De door mij onderzochte stammen van zeer uiteenlopende afkomst laten zich dus in verband met hun gedrag ten opzichte van de reactie van *Voges* en *Proskauer*, met betrekking tot hun groei in de citraathoudende, anorganische voedingsbodem (*Koser*) en door verschil in fermentatiefvermogen tot de volgende groepen rangschikken:

Het valt dadelijk op, dat er slechts één enkele groep bestaat, welke zich negatief verhoudt ten opzichte van de reactie van V.P., met andere woorden: geen methyl acetyl carbinol vormt uit glucose! Verder blijkt, dat deze gehele groep homogeen van eigenschappen is en als volgt kan worden omschreven:

V.P.	negatief	} Iste groep (Friedländer)
Citraat:	positief	
Glycerine:	positief	
Adoniet:	positief	
Dulciet:	positief	
Lactose:	positief	

Hiertegenover staat niet één enkele groep, maar staan verschillende groepen, die alle V.P.-positief zijn, onderling echter verschillen, doordat twee citraat-negatief blijken te zijn, terwijl de andere groepen alle citraat-positief zich gedragen.

De beide eerst-bedoelden wijken van het aerogenes-type af en zijn, evenals de reeds omschreven eerste groep, dan ook niet als identiek met *B. lactis aerogenes* te beschouwen, de laatst-bedoelden echter zijn er niet van te onderscheiden, zij komen immers in de kenmerkende eigenschappen: V.P.-, zowel als citraat-positief, geheel met aerogenes overeen.

Als IIde groep is dan te beschouwen dat pneumoniae-type, hetgeen de onderstaande kenmerken draagt:

V.P.	positief	} IIde groep (Frankland)
Citraat:	negatief	
Glycerine:	negatief	
Dulciet:	negatief	
Lactose:	negatief	

Als IIIde groep is hieraan toe te voegen de volgende:

V.P.	positief	} IIIde groep (Misk)
Citraat:	negatief	
Glycerine:	positief	
Adoniet:	positief	
Dulciet:	positief	
Lactose:	positief	

Ik zou geneigd zijn, om aan het eerste type de naam van *Friedländer* te verbinden, aan het tweede de naam *Frankland* te geven, terwijl het derde als *Misk* zou zijn aan te duiden, omdat deze stam, afkomstig van het Institut Pasteur te Parijs, onder die benaming mij werd toegezonden.

Het is bekend, dat *Frankland*, *Stanley* en *Frew* in 1891 de pneumobacterie beschreven als *niet* in staat glycerine, noch dulciet te ontleden, in tegenstelling met *Grimbert*, die steeds deze beide stoffen zag vergisten.

Sedert dien staat *B. pneumoniae* als ten minste tot twee types behorende bekend, waarvan het glycerine- en dulciet-negatieve veelal als het type *Frankland* te boek staat.

Wat nu betreft de overige stammen, die ik alle als aerogenes beschouw, daarvan is het volgende te vermelden:

Zij zijn gekenmerkt, doordat zij V.P.-positief en citraat-positief zijn. De te mijner beschikking staande stammen gaven geen homogeen beeld, maar zij verschilden onderling met betrekking tot hun fermentatieve eigenschappen. Tot dusver is het mij niet gelukt die verschillende combinaties vast te stellen, nml.:

	1.	2.	3.	} IVde groep (Aerogenes)
Glycerine:	positief	positief	positief	
Adoniet:	positief	negatief	negatief	
Dulciet:	negatief	negatief	positief	
Lactose:	positief	positief	negatief	

Ik sluit hierbij dus de mogelijkheid niet uit, dat ook andere combinaties zullen kunnen worden gevonden.

De stammen, mij door het Listerinstituut als *B. pneumoniae* gezonden, zijn gebleken tot drie verschillende types te behoren, t.w.:

Eén van het type I, of Friedländer, en twee stammen van het aerogenestype.

Van de stammen, afkomstig van het Institut Pasteur, waren drie van het type II, of Frankland, en één van type III, of Misk.

De stam, afkomstig van collega Wolff te Utrecht, was inderdaad een echt Friedländer-type, evenals die van collega Aldershoff.

De onder verschillende benamingen, mij zoo welwillend toegezonden stammen uit het laboratorium van collega Snijders te Amsterdam, behoorden tot drie verschillende types, nml.: 4 Frankland, 2 Friedländer en 4 aerogenes.

De twee stammen van collega van Loghem waren Frankland.

In Utrecht werden enige stammen van patiënten geïsoleerd, welke als volgt werden gedetermineerd: één stam behoorde tot het Friedländertype, twee tot het Franklandtype en twee tot het aerogenestype.

Indien wij de aldus onderzochte 26 stammen nader groepeeren, dan blijkt het, dat daarvan 6 tot het Friedländer, II tot het Frankland, 8 tot het aerogenestype en I tot het Misktype behoren.

Daar het onderzoek werd verricht met S-, zowel als met R-vormen, kan nog worden medegedeeld, dat de culturele eigenschappen dier beide volkomen gelijk waren, nergens werd enige onderlinge afwijking waargenomen; het fermentatief samenstel is dus in die twee toestanden van verschillend antigeenkarakter, gelijk.

Collega Snijders stelde mij ter beschikking een zogenaamde, originele Friedländerbacterie, afkomstig uit het Lister Institute en gemerkt „probably original”, dit was inderdaad het door mij als Friedländer aangeduide type; een tweede, afkomstig uit de verzameling Krall, opgekweekt door Pribram, in 1928, en één

uit die zelfde verzameling, gemerkt Rudolfstiftung 1917, zijn beide tot het Franklandtype te brengen; hetzelfde is van de stam Hofbauer, eveneens uit de genoemde verzameling afkomstig, te zeggen.

Het Friedländer-type gaf steeds in de door mij onderzochte stammen een positieve eigenschap ten opzichte van de glucose-vergisting bij 45° te zien, terwijl ook de methyloordreactie positief verliep; de groei in citraat en die in urinezuur werden eveneens steeds positief gevonden.

Het Frankland-type gaf een juist omgekeerd beeld, het is in al deze kenmerkende eigenschappen negatief.

Het Misk-type, waarvan mij maar één enkele stam in handen viel, is daarentegen weder positief aangelegd, verschilt enkel en alleen, doordat het een positieve V.P. met een negatieve citraatgroei combineert, van het Friedländer-type. Het is thermotolerant, methyloord-positief, maar weder urinezuur-negatief.

Conclusions et résumé.

L'étude ci-dessus s'occupe de la question, si le pneumobacille est une „species sui generis” ou non, c.à.d. elle traite le problème: Est-il possible de discerner cet organisme de ses proches parents, le colibacille et le bacille aérogène, une question qui n'est pas encore jusqu'à présent définitivement résolue.

En étudiant les propriétés de 26 souches d'origine très variée, il paraît possible de distinguer en effet le pneumobacille du type de *Friedländer*, du colibacille et du bacille aérogène.

Pourtant il ne s'agit pas d'une seule espèce, mais on est persuadé d'accepter l'existence au moins de trois, probablement de quatre espèces différentes, toutes décrites dans la littérature sous le nom simple de *Bactérium pneumoniae*.

Il suffit de réunir dans les tableaux suivants les propriétés divergentes de ces organismes si étroitement parentés pour démontrer nettement la différence essentielle entre eux.

	B. coli	B. pneumoniae		B. aérogène
		I	II	
Réaction de Voges et Proskauer (la formation de méthylacétylcarbinol)	—	—	+	+
Réaction du rouge de méthyle . .	+	+	—	—
Développement dans le milieu synthétique de Koser.				
a) citrate de soude	—	+	—	+
b) acide urique	—	+	—	+

Il n'existe donc aucune conformité de propriétés entre les microbes mentionnés. Cependant il faut remarquer qu'on a jusqu'à présent considéré le bacille aérogène comme identique avec le bacille de Friedländer!

Ci-dessous j'ai réuni dans un tableau les quatre types du pneumobacille qu'on peut discerner.

	Bacterium pneumoniae.			
	I	II	III	IV
Réaction de V. et P.	—	+	+	+
Développement dans le milieu de Koser (citrate de soude)	+	—	—	+
Fermentation de Glycérine	+	—	+	+
" Adonite	+	—	+	variable
" Dulcite	+	—	+	variable
" Lactose	+	—	+	variable

On distingue depuis longtemps deux races du pneumobacille, c.à.d. la race, nommée Friedländer et la race, nommée Frankland, qui se différencient par la fermentation de la glycérine. Le bacille de Friedländer attaque cet alcool, tandis que celui de Frankland ne l'attaque pas du tout.

Je propose de nommer le type I: B. pneumoniae α Friedländer; le type II: B. pneumoniae β Frankland; le type III: B. pneumoniae γ Misk¹⁾ et le type IV: B. lactis aerogenes.

¹⁾ Souche originaire de l'Institut Pasteur à Paris et indiquée B. pneumoniae, Misk.

Vergelijkende onderzoeken over de immuniseerende werking van onverdund en verdund diphtherie-anatoxine

DOOR

Dr. W. AEG. TIMMERMAN, directeur

en

Dr. A. C. BRANDWIJK, seroloog

Vele onderzoekers hebben zich bezig gehouden met de vraag, hoe de immuniseerende werking van een diphtherie-anatoxine kan worden gemeten.

De feitelijke waarde van een voorbehoedende entstof kan uitsluitend uit de praktijk blijken. Te dien einde moeten twee groepen van kinderen gelijktijdig met elkander worden vergeleken, waarvan de eene wèl, de andere niet met de te onderzoeken entstof is behandeld. Gevolgtrekkingen over de immuniseerende werking hiervan mogen natuurlijk slechts dan worden gemaakt, indien de beide groepen overigens geheel gelijkwaardig en dus vergelijkbaar zijn. Dat wil zeggen, dat de leeftijdsverdeeling gelijk moet zijn, dat de kinderen onder gelijke omstandigheden van plaats en tijd moeten verkeerden, dat gelet moet worden op het sociale milieu, op het aantal broers en zusters, enz. Aan al deze eischen wordt het beste — ofschoon nog niet op ideale wijze — voldaan door alterneerend te enten, nl. om het andere kind van elk gezin. Op deze wijze is het mogelijk statistisch waardevolle verschillen vast te stellen ten opzichte van de morbiditeit en letaliteit aan diphtherie bij de wel- en niet-geïmmuniseerden.

Nog afgezien van het feit, dat de boven beschreven werkwijze, althans wat diphtherie betreft, niet wel uitvoerbaar is,

kleeft er het zeer groote bezwaar aan, dat zij enorm veel tijd kost en dat pas na een zeer lange waarnemingsperiode eenig inzicht in het nuttig effect van de entstof kan worden verkregen. Deze gegevens, hoe waardevol ook, zijn natuurlijk van geen belang voor den bereider van het anatoxine, die — alvorens hij zijn preaparaat ter beschikking stelt — zoo goed mogelijk moet zijn ingelicht over de waarde als immuniseeringsmiddel. Hij zag dus uit naar een methode, welke hem in staat kan stellen hiervan in het laboratorium en in betrekkelijk korten tijd een juisten indruk te verkrijgen.

Nu is *Ramon* van den beginne af de meening toegedaan geweest, dat de vlokkingswaarde van een anatoxine een zuivere graadmeter van de antigene werking is. Ook thans verdedigt hij nog deze opvatting, ofschoon niet meer zoo sterk als vroeger. Het wil ons voorkomen, dat dit standpunt niet houdbaar is. Hoewel er ongetwijfeld een zeker parallelisme bestaat, in dier voege, dat een anatoxine met een zeer lage vlokkingsgraad minder goed zal immuniseeren dan een met een hooge Lf, zoo is de gevolgtrekking, dat twee anatoxines van gelijke vlokkingswaarde ook een gelijke immuniseerende werking moeten hebben, toch zeker niet juist.

Een andere wijze van bepaling der antigene waarde vinden wij in de dierproef. Deze wordt aldus uitgevoerd, dat caviae één of meermalen met het te onderzoeken preaparaat worden ingespoten. Na een zekeren tijd wordt dan de graad van onvatbaarheid van deze dieren vastgesteld. Dit kan geschieden door te onderzoeken, hoeveel doodelijke doses van een diphtherietoxine bij deze dieren ongestraft onderhuids kunnen worden ingespoten, of door na te gaan hoeveel toxine in de huid moet worden gebracht, teneinde een reactie op te roepen, zooals door *Schick* is beschreven. Waar de bepaling der vlokkingswaarde in de reageerbuis plaats greep, wordt hiermede het onderzoeksterrein verlegd naar de dierproef. Dit beteekent zonder twiifel een vooruitgang. Wij krijgen een inzicht in de biologische werking van het anatoxine, al mogen wij nimmer het groote verschil uit het oog verliezen, dat er bestaat, niet alleen tusschen mensch en proefdier, maar ook tusschen de wijze van besmetting bij den mensch — waarschijnlijk via de neuskeelholte en met levende diphtheriebacillen — en de parenterale intoxicatie bij de cavia, met diphtheriegif zonder bacillen. Toch verschaft

deze methode van onderzoek waardevolle gegevens over de antigene waarde van een praeparaat: zij wordt dan ook veelvuldig voor dit doel toegepast.

Maar ook in ander opzicht kan zij van groot nut zijn. Immers bij de bestudeering der entstoffen komen vele vragen naar voren. Hoeveel vlokkingseenheden moeten worden ingespoten om een zoo hoog mogelijke immuniteit te verkrijgen, over hoeveel inspuitingen moet de immunisatie worden verdeeld, welke tusschenruimte moet tusschen de verschillende injecties in acht worden genomen, wanneer ontwikkelt zich de immuniteit, en vele andere?

Bij ons rees de volgende vraag: is de immuniseerende werking van een bepaalde hoeveelheid van een anatoxine afhankelijk van de hoeveelheid vloeistof, waarin het wordt ingespoten? Met andere woorden: zijn de dieren, die met een zekere hoeveelheid van een onverdund anatoxine zijn behandeld, meer of minder onvatbaar dan de dieren, welke op gelijke wijze zijn ingespoten met evenveel van hetzelfde anatoxine, dat echter van te voren eenige malen is verdund, zoodat de totale hoeveelheid ingespoten vloeistof ook even zoovele malen is toegekommen?

De beantwoording van deze vraag is van practisch belang. Immers zoo het mocht blijken, dat er inderdaad duidelijke verschillen in onvatbaarheid zijn, dient te worden overwogen of hiermede ook rekening moet worden gehouden bij de immuniseering van kinderen tegen diphtherie.

In twee series proefnemingen hebben wij getracht een antwoord op deze vraag te vinden. Bij de eerste proevenreeks, welke in den winter van 1933 werd uitgevoerd, maar nog niet gepubliceerd, werd een aantal caviae door middel van drie inspuitingen geïmmuniseerd en daarna, na een zekeren tijd, nagegaan, hoe zij zich gedroegen na inspuiting van een bepaalde hoeveelheid diphtheriegif.

Bij de tweede, onlangs uitgevoerde, reeks werden de dieren met behulp van één inspuiting geïmmuniseerd en daarna, op verschillende tijdstippen, de graad der onvatbaarheid onderzocht met behulp der zoogenaamde multipele Schickreactie.

Beide series worden in het onderstaande nader beschreven.

Immunisering in drie inspuitingen.

Proef A (tabel I). Gebruikt werd het in dit Instituut bereide anatoxine VI met 12 vlokkingseenheden per cm^3 , waarvan werd ingespoten met tusschenruimten van één week $\frac{1}{2}$, 1 en 1 cm^3 , tezamen dus 30 vlokkingseenheden. In onverdunden toestand ingespoten, bedroeg de totale hoeveelheid vloeistof dus 2,5 cm^3 , in den $5 \times$ verdunden toestand 12,5 cm^3 . 4 weken na de laatste inspuiting werden bij alle dieren 20 d.l.m. ingespoten.

TABEL I.

3 injecties met in totaal 30 vlokkingseenheden anatoxine VI in 2,5 en 12,5 cm^3 , 20 d.l.m. 4 weken na laatste inspuiting.

	Totaal aantal dieren	Overlevend	%	geen necrose	%
Onverdund	39	29	74	16	41
Verdund	28	27	96	20	71

Proef B (tabel II). Herhaling van proef A met anatoxine IX, evenzoo alhier bereid, doch met een vlokkingswaarde van 16,5 per cm^3 , zoodat dus in totaal werden ingespoten 41,25 vlokkingseenheden in respectievelijk 2,5 en 12,5 cm^3 . 20 d.l.m. 4 weken na de laatste inspuiting.

TABEL II.

3 injecties met in totaal 41,25 vlokkingseenheden anatoxine IX in 2,5 en 12,5 cm^3 , 20 d.l.m. 4 weken na laatste inspuiting.

	Totaal aantal dieren	Overlevend	%	geen necrose	%
Onverdund	43	17	44	5	11
Verdund	40	27	68	16	40

Proef C (tabel III). Herhaling van proef A, met dien verstande, dat gebruik werd gemaakt van een origineel anatoxine van *Ramon*, met een vlokkingswaarde van 12, zoodat in totaal werden ingespoten 30 vlokkingseenheden in respectievelijk 2,5 en 12,5 cm^3 . 20 d.l.m. 4 weken na de laatste inspuiting.

TABEL III.

3 injecties met in totaal 30 vlokkingseenheden anatoxine Ramon in 2,5 en 12,5 cm³, 20 d.l.m. 4 weken na laatste inspuiting.

	Totaal aantal dieren	Overlevend	%	geen necrose	%
Onverdund	43	29	67	17	58
Verdund	34	28	82	22	79

Proef D (Tabel IV.) Herhaling van proef B, dus met het anatoxine IX, zoodat dus werden ingespoten 41,25 vlokkingseenheden in respectievelijk 2,5 en 12,5 cm³. 20 d.l.m. 6 weken na de laatste inspuiting.

TABEL IV.

3 injecties met in totaal 41,25 vlokkingseenheden anatoxine IX, in 2,5 en 12,5 cm³, 20 d.l.m. 6 weken na laatste inspuiting.

	Totaal aantal dieren	Overlevend	%	geen necrose	%
Onverdund	36	18	50	4	11
Verdund	28	24	86	10	36

Resultaten.

Een analyse van de vier bovenstaande proeven brengt opvallende verschillen aan het licht tusschen de resultaten der entingen met onverdund en met vijfmaal verdund anatoxine. Immers in alle vier reeksen is het percentage der overlevende dieren, die met onverdunde entstof zijn behandeld, aanmerkelijk lager dan van de met vijfmaal verdunde entstof behandelde dieren (figuur I). Bij de eerste drie proeven is het onderzoek naar den graad der onvatbaarheid steeds 4 weken na de laatste inspuiting ingesteld; bij de vierde groep had dit onderzoek na 6 weken plaats. Wij meenen uit deze gelijkluidende resultaten de gevolgtrekking te mogen maken, dat bij caviae de immuniteit vier weken na een drievoudige behandeling met vijfmaal verdunde anatoxines, aanmerkelijk grooter is dan bij de dieren, die op dezelfde wijze met dezelfde, doch onverdunde anatoxines behandeld zijn, het geval is (Proeven A, B en C). De in simplo

FIGUUR I.

Percentage der overlevende dieren.

Gearceerd: geïmmuniseerd met onverdunde entstof.

Wit: " " verdunde "

%

100 .

90 .

80 .

70 .

60 .

50 .

40 .

30 .

20 .

10 .

.

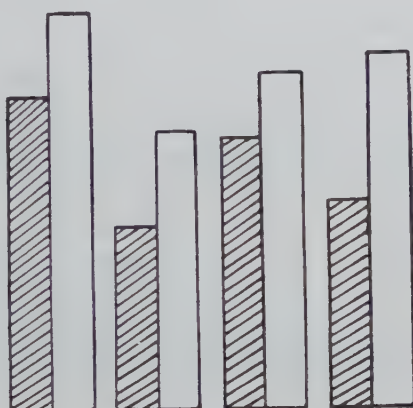
Proef

A

B

C

D



uitgevoerde proef D is voorts een aanwijzing, dat hetzelfde het geval is zes weken na afloop van de immuniseerende behandeling.

Ook uit de reactie der overlevende dieren op het hun toegediende diphtherietoxine kan nog het een en ander worden afgeleid. In de twee laatste kolommen van de tabellen I tot en met IV zien wij immers, dat bij alle proeven het percentage der dieren, waarbij geen necroses optreden, grooter is bij de „verdund” dan bij de „onverdund” geïmmuniseerde. Hoe sterker de reactie, des te geringer de immuniteit. Ook dit wijst dus op een sterker immuniseerende werking van de verdunde entstoffen.

Immuniseering in één inspuiting.

Alle dieren werden geïmmuniseerd met een in dit Instituut bereid anatoxine van een vlokkingsswaarde 13, waarvan ze $0,5 \text{ cm}^3$ kregen toegediend. De eene helft ontving deze hoeveelheid anatoxine onverdund, dus inderdaad in $0,5 \text{ cm}^3$; voor de andere helft werd de entstof tien maal met physiologische zout-solutie verdund: hun werd derhalve 5 cm^3 toegediend.

Waar in de eerste serie proefnemingen — althans in drie van de vier proeven — de immuniteit na één en dezelfde tijd werd onderzocht, werd thans getracht deze op verschillende

tijdstippen na te gaan. Van beide groepen geïmmuniseerde dieren werd daarom een aantal onderzocht na 1, 2, 3, 4, 6, 8 en 12 weken. Ook de wijze, waarop dit onderzoek geschiedde, was anders dan bij de vroegere proeven. Toen werd uitsluitend bepaald of de onvatbaarheid der dieren voldoende sterk was, om de inspuiting van 20 d.l.m. te kunnen doorstaan. Thans werd elk dier op 6 verschillende plaatsen intracutaan ingespoten met $0,2 \text{ cm}^3$ van een meer of minder sterk verdund diphtherietoxine. De verdunningen werden zoodanig gekozen, dat de geringste inspuiting juist gelijk was aan 1 Schicktestdosis, de volgende respectievelijk 2, 5, 10, 25 en 50 maal deze doses. De graad der immuniteit werd afgeleid uit de maximale hoeveelheid toxine, die in de huid kon worden ingespoten, zonder dat een reactie optrad, zooals wij die bij onvoorbehandelde caviae kennen, wanneer 1 Schicktest-dosis wordt toegediend. Bovendien biedt deze methode de gelegenheid ons eenige inlichtingen te verschaffen over de onvatbaarheid, gemeten aan de hoeveelheid diphtheriegif, welke het dier kan verdragen. Immers tezamen worden 93 Schicktest-doses ingespoten. 1 Schicktest-dosis is $\frac{1}{50}$ d.l.m. In totaal worden de dieren dus met bijna 2 d.l.m. (voor caviae van 250 gr.) ingespoten. Men diene evenwel in het oog te houden, dat de door ons gebruikte dieren zwaarder dan 250 gram waren en bovendien dat het niet onverschillig is of de caviae een bepaalde hoeveelheid gif onderhuids krijgen toegediend, dan wel in de huid. De gevoeligheid is in deze beide gevallen niet dezelfde.

Iedere groep bestond uit ongeveer 2×15 dieren, zoodat dus steeds tegelijkertijd evenzoovele „onverdund” en „verdund” behandelde dieren met elkander werden vergeleken.

In tabel V is de uitslag der multipele Schick-reacties neergelegd.

Deze tabel is als volgt samengesteld. Van alle dieren uit één groep werd het aantal Schick-test-doses, dat zonder reactie kon worden ingespoten, bepaald. Deze werden opgeteld en de som door het aantal dieren van de groep gedeeld. Op deze wijze werd het aantal Schick-test-doses verkregen, dat in een bepaalde groep gemiddeld per dier kon worden ingespoten, zonder een huidreactie op te wekken. Dit is zonder twijfel een ruwe methode. Immers de hoeveelheid toegediend toxine stijgt vrij snel, nl. van 1 op respect. 2, 5, 10, 25 en 50 Schick-test-doses,

TABEL V.

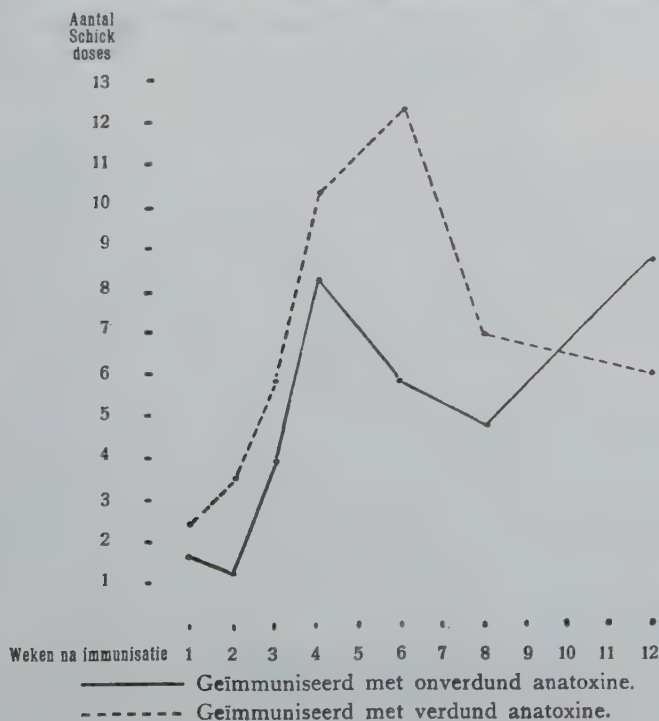
Gemiddeld aantal Schick-test-doses, dat per dier geen huidreactie te voorschijn roept.

Weken na immunisatie.	Onverdund	Verdund
1	1,6	2,4
2	1,2	3,5
3	3,7	5,9
4	8,3	10,3
6	5,7	12,3
8	4,6	6,8
12	8,7	6,0

zoodat een negatieve reactie op tusschenliggende waarden ons ontging. Toch geeft zij zonder twijfel een indruk van den graad der immuniteit. Wanneer we dit in een curve uitdrukken, ontstaat figuur II.

FIGUUR II.

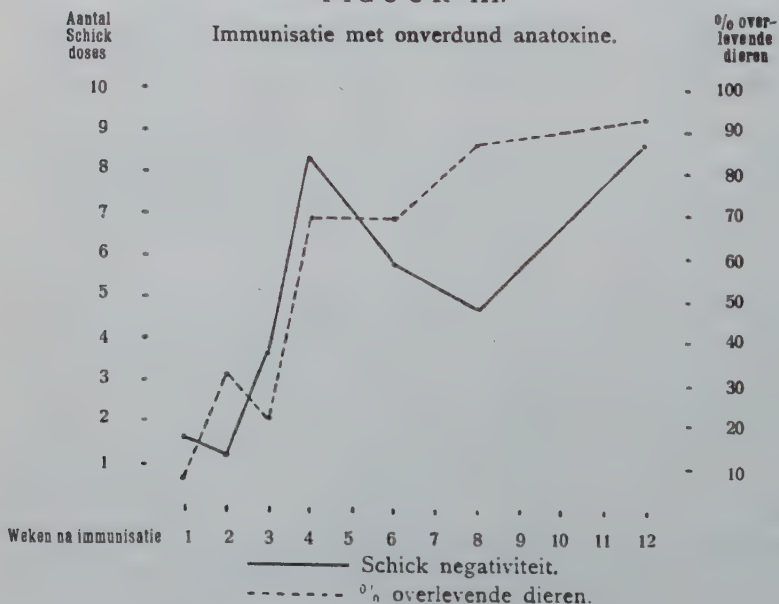
Gemiddeld aantal negatieve Schick doses per dier van iedere groep.



Het blijkt, dat de gemiddelde immuniteit van de met onverdund anatoxine behandelde dieren tot en met 8 weken na de immunisatie altijd lager is dan die van de met verdund anatoxine behandelde. Deze uitkomsten zijn dus in overeenstemming met de op andere wijze verkregen resultaten bij de eerste proefserie.

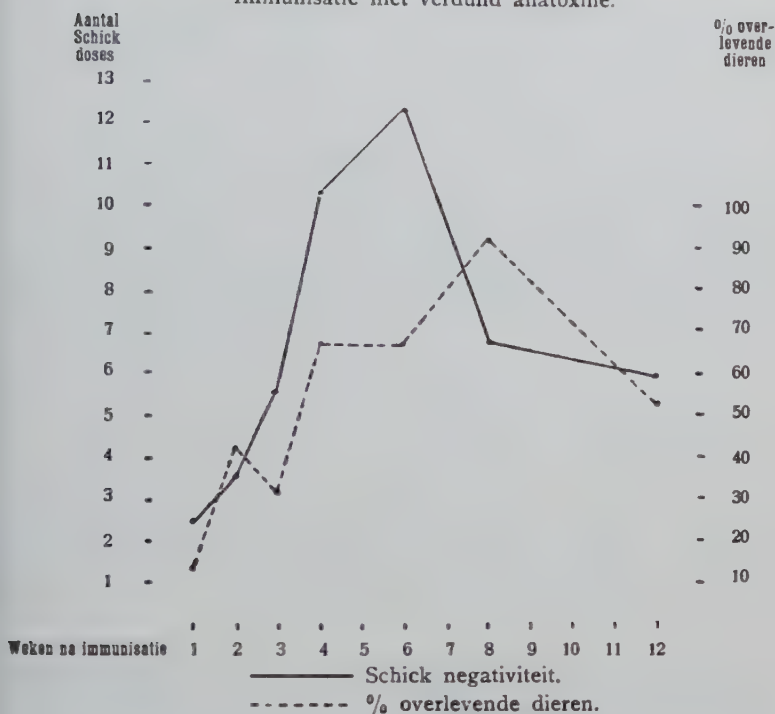
Het is nu echter eigenaardig, dat bij het laatste onderzoek, 12 weken na de immunisatie, de beide lijnen elkander kruisen, zoodat de immuniteit der met onverdund anatoxine behandelde dieren boven die van de met verdund anatoxine behandelde stijgt. Het is zeer jammer, dat onze voorraad geïmmuniseerde dieren na de laatste proef was uitgeput; het zou van het grootste belang geweest zijn op een nog later tijdstip na te gaan, of deze verandering gehandhaafd bleef of niet. Wij durven thans niet met zekerheid te zeggen, welke beteekenis er aan moet worden gehecht. Toch meenen wij wel een aanwijzing te hebben, dat dit verschil niet op een toeval berust. Immers, wanneer wij ook rekening houden met het percentage der dieren, dat de intracutane inspuiting met 93 Schick-test-doses (zie boven) overleeft en deze percentages, met die der gemiddelde Schick-negativiteit, voor de „verdunde” en „onverdunde” groep afzonderlijk, in curve brengen, dan blijkt het volgende (Fig. III en IV):

FIGUUR III.



FIGUUR IV.

Immunisatie met verdund anatoxine.



De beide groepen van curves zijn verschillend. Die der „onverdund-geïmmuniseerde” dieren (Fig. III) vertoont zoowel wat de Schick-negativiteit, als wat het percentage der overlevende dieren betreft, na 12 weken nog geen neiging tot daling, eerder tot stijging. Die der „verdund-geïmmuniseerde” dieren schijnt reeds vroeger haar hoogtepunt te hebben bereikt en na 12 weken in volle daling te zijn.

Het is verre van ons thans reeds gevolgtrekkingen uit deze waarnemingen te maken. Mocht het uit voortgezette proefnemingen — die uitermate gewenscht zijn — blijken, dat het bovenstaande verschil opnieuw voor den dag komt, dan zal de vraag of een en ander consequenties voor de praktijk der immunisatie van menschen heeft, onder oogen moeten worden gezien.

Gaan wij thans na in hoeverre soortgelijke proefnemingen reeds eerder zijn genomen, dan blijkt het, dat uitsluitend

Hartley ¹⁾ zich hiermede heeft bezig gehouden. Hij immuniseerde 2 groepen van elk 15 caviae eenmaal met 5 vlokkingseenheden van een zelfde gezuiverd anatoxine, met dien verstande, dat de dieren van de eerste groep deze 5 eenheden in $0,5 \text{ cm}^3$, die van de tweede groep in 5 cm^3 (met zoutoplossing verdund) toegediend kregen. Na 4 weken werd de graad der onvatbaarheid met behulp van de multiële Schickproeven nagegaan. *Hartley* vond, evenals wij op dat zelfde tijdstip, de immuniteit der „onverdund geïmmuniseerde” dieren lager dan die der „verdund-geïmmuniseerde”. Berekenen men uit *Hartley's* tabel het gemiddeld aantal Schick-doses, dat één dier reactieloos kan verdragen, dan blijkt dit voor de „onverdund-geïmmuniseerde” caviae nog geen 3, voor de „verdund-geïmmuniseerde” ruim 25 te bedragen. Zijn verschillen zijn dus veel grooter dan de onze, maar stemmen er in wezen mede overeen.

Bij immunisatie der caviae in 2 inspuitingen met een tusschenruimte van 19 dagen, verkreeg *Hartley* 9 dagen na de 2e inspuiting, de beste resultaten, wanneer zowel de eerste als de tweede injectie verdund, dus in 5 cm^3 , waren toegediend. Ook hier dus wederom hetzelfde verschijnsel.

Vraagt men zich tenslotte af, waardoor de vastgestelde verschillen worden veroorzaakt, dan kan men zich denken, dat anatoxine in de grootere hoeveelheid vloeistof, langzamer wordt geabsorbeerd en langzamer uitgescheiden, waardoor het dus langer in aanraking met het lichaam blijft. *Hartley* oppert ook de mogelijkheid, dat de groote hoeveelheid vloeistof meer cellen in aanraking brengt met het anatoxine. Wel ontvangt iedere antistofvormende cel dan een geringere hoeveelheid van de entstof. In hoeverre dit voor de antitoxinevorming een nadeel of een voordeel is, kunnen wij niet beoordeelen. Het is zeer goed denkbaar, dat een overdosering de antitoxinevorming schaadt.

Dit zijn tenslotte slechts hypothesen. Wil men een inzicht krijgen in de oorzaak der waargenomen verschillen in onvatbaarheid, dan zal onder meer moeten worden nagegaan of er verschil in uitscheidingstijd bestaat tusschen de verdunde en onverdunde entstoffen. Verder komt de vraag naar voren, of de aard van het verdunningsmiddel van invloed is. Voortgezette onderzoekingen zullen in dit vraagstuk misschien meer licht kunnen verschaffen.

CONCLUSIES.

1. De immuniseerende werking van diphtherie-anatoxines is, bij gelijke hoeveelheden van de entstof zelf, afhankelijk van de totale hoeveelheid vloeistof, die bij de dieren wordt ingespoten.
2. In een periode, vallende tusschen ongeveer vier en acht weken na afloop der immunisatie, zijn de dieren, welke met onverdunde entstof zijn behandeld, minder onvatbaar dan degene, die met verdunde entstof zijn geïmmuniseerd.
3. Er zijn aanwijzingen, dat de verhoudingen op een later tijdstip veranderen.

LITERATUUR.

1. *Hartley, P. Br. Jl. Exp. Path.* 1935, 16, 468.
-

Differentiatie van in boterzuursels voorkomende melkzuurbacteriën

DOOR

W. C. SMIT.

Inleiding.

Terwijl de bereiding van boter een proces is, dat reeds eeuwen wordt toegepast, dateert het gebruik van boterzuursels eerst uit de laatste helft van de vorige eeuw. De ontwikkeling der microbiologie heeft het mogelijk gemaakt aan de willekeur van het toeval bij het verzuren van room ter verkrijging van boter van goede kwaliteit een einde te maken. Het is gebleken, dat voor een doelmatige bereiding van boter de hulp der in melkproducten steeds aanwezige melkzuurbacteriën zeer moeilijk kan worden ontbeerd.

Van de onderzoekers, welke zich vóór 1900 met de bestudeering der natuurlijke melkflora hebben beziggehouden, moeten allereerst *Conn* in Amerika en *Storch* in Denemarken worden genoemd. Beide hielden zich reeds omstreeks 1890 bezig met het onderzoek van het zgn. rijpen, d.i. verzuren van de room en isoleerden reeds reïncultures van melkzuurbacteriën. In dezen tijd begint het gebruik van cultures van bacteriën voor de verzuring van room, vooral in Denemarken. In de volgende jaren neemt het gebruik van zuursels wel toe, maar het inzicht in de processen, welke in zuur wordende melk of room plaats hebben, wordt weinig verrijkt, totdat in de jaren 1917—1919 op drie verschillende plaatsen van de wereld de ontdekking wordt bericht van de zgn. *aromabacteriën*.

De eerste publicatie is ongetwijfeld van de hand van den Nederlandschen onderzoeker *Boekhout* ¹⁾, later ook verschenen in samenwerking met *Ott de Vries* ²⁾. Kort na daarna, omstreeks 1919 verschijnen, onafhankelijk hiervan, de publicaties

van *Storch* in Denemarken ³⁾ en van *Hammer* en medewerkers ⁴⁾ in Amerika. Belangrijke nieuwere onderzoekingen over de bacteriologie der boterzuursels zijn verricht door *Orla-Jensen* en medewerkers ⁵⁾, door *Knudsen* en *Sørensen* ⁶⁾, door *Boekhout* en *Van Beynum* ⁷⁾ en door *Van Beynum* ⁸⁾.

Het mag verwondering wekken, dat deze aromabacteriën eerst tientallen jaren na de eerste onderzoekingen van boterzuursels zijn gevonden. De reden hiervan is te zoeken: 1° in de omstandigheid, dat deze bacteriën zich microscopisch niet onderscheiden van de overige coccusvormige melkzuurbacteriën en 2° in de geringe activiteit van deze bacteriën in normale melk, waardoor een verandering hierin niet of nauwelijks valt te bespeuren. De aromabacteriën ontwikkelen zich slecht op de gebruikelijke voedingsbodems, zijn in veel opzichten gevoeliger en veeleischender dan de „gewone” melkzuurbacteriën. Deze laatste zijn herhaaldelijk beschreven sinds *Lister* hen als *Bacterium lactis* onderscheidde in 1878.

Een goed boterzuursel behoort te zijn een mengcultuur in melk van verschillende melkzuurbacteriën, nl. van „gewone” melkzuurbacteriën en aromabacteriën.

Systematiek en Nomenclatuur.

De verdienste in de systematiek der melkzuurbacteriën orde te hebben gebracht, komt toe aan *Orla-Jensen* ⁹⁾, die in 1919 een groot aantal in melk en melkproducten altijd voorkomende bacteriën samenbracht in één groote groep, welke scherp werd onderscheiden van de overige bacteriën. Deze groep werd door hem die der *Ware Melkzuurbacteriën* genoemd. Hoewel deze systematiek niet algemeen wordt aanvaard, met name niet door de Amerikaansche systematici ¹⁰⁾, zal in het volgende uitsluitend hiermee rekening worden gehouden.

Orla-Jensen brengt bij de „Ware Melkzuurbacteriën” onder alle bacteriën, welke grampositief, katalasenegatief, asporogeen en onbeweeglijk *) zijn. Zij stellen hoge eischen aan hun stikstofvoeding. Onderscheiden worden coccen en staven. De coccusvormige bacteriën kunnen weer in twee groepen worden gesplitst, welke het best kunnen worden onderscheiden als homofermentatief en heterofermentatief (vergel. hieronder). Het

*) De bewegelijke melkzuurstreptococci, reeds in 1890 door *Storch* beschreven, worden slechts bij hoge uitzondering aangetroffen.

zijn nu deze laatste twee subgroepen van melkzuurbacteriën, welke deel uitmaken van de flora van een goed boterzuursel. Staafvormige melkzuurbacteriën mogen niet aanwezig zijn, daar deze dikwijls in staat zijn groote hoeveelheden zuur te vormen.

Beschrijving.

De homofermentatieve melkzuurbacteriën zijn als melkzuurbacteriën representatief voor hun soort; zij zetten koolhydraten bijna uitsluitend om in melkzuur (en wel d-melkzuur) en vormen slechts zeer weinig bijproducten. Zij vormen de groote meerderheid in de flora der boterzuursels en wel behooren de hierin voorkomende soorten alle tot het geslacht *Streptococcus*. Hieronder vallen de voornaamste, altijd in zuursels aanwezige soorten: *Sc. lactis* en *Sc. cremoris*. Deze beide soorten vertoonen onderling slechts geringe verschillen, de eerste is in staat maltose te vergisten, terwijl dit vermogen bij de tweede ontbreekt of zeer zwak is, bovendien is *Sc. cremoris* meer dan *Sc. lactis* geneigd kettingen te vormen onder dezelfde omstandigheden. Ook het vermogen tot het vormen van bijproducten is bij *Sc. cremoris* iets grooter. Deze bacterie is, meer dan *Sc. lactis*, te beschouwen als een echte melkbacterie.

De heterofermentatieve melkzuurbacteriën vormen uit koolhydraten naast melkzuur, (l-melkzuur), belangrijke hoeveelheden bijproducten, nl. koolzuur *), azijnzuur en aethylalcohol, het belangrijkste is echter in dit verband, dat deze bacteriën in staat zijn aromatische bijproducten te vormen in zeer geringe hoeveelheden, waarschijnlijk geheel of gedeeltelijk uit het citroenzuur, dat in melk nooit ontbreekt. Het hoofdbestanddeel van het aroma wordt gevormd door diacetyl ¹¹⁾). Deze bacteriën zijn het dan ook, die aan de boter het aroma geven en zij worden daarom meestal met den naam *Aromabacteriën* aangeduid. Zij behooren tot het door *Orla-Jensen* opgestelde geslacht *Betacoccus*. In boterzuursels komt slechts één soort voor, nl. *Betacoccus cremoris*. De verschillende stammen kunnen echter ten aanzien van het vergistingsvermogen van suikers vrij sterk uiteenloopen, zoodat *Knudsen* en *Sørensen* (l.c.) dan ook nog onderscheiden x-vormen en a-vormen, waarvan de eerste, aansluitend bij *Storch's* x-bacteriën, het minst actief zijn, niet in

*) De vorming van waterstof is, voor zoover deze bestaat, in elk geval minimaal.

staat maltose te vergisten, terwijl de meer actieve a-vormen daartoe wel in staat zijn. Karakteristiek voor de betacoccen is hun slechte ontwikkeling in melk en de sterk groei-stimuleerende werking, die uitgaat van sommige stoffen als b.v. gistautolysaat.

De differentiatie van streptococcen en betacoccen.

Door microscopische waarneming alleen valt niet uit te maken, of men met streptococcen of met betacoccen te maken heeft. Reincultures in melk geven onder bepaalde omstandigheden bij streptococcen groote cellen te zien, bij betacoccen kleine. Het is onvoorzichtig hieruit conclusies te trekken. Betacoccen komen zoowel in de streptococcus- als in de diplococcus-gedaante voor. (Zie de microfoto's 1 en 2, beide van betacoccen.) De morphologie der cellen en celverbanden van de streptococcen mag als bekend worden verondersteld. (Zie hiervoor vooral de vele foto's in de reeds genoemde monographie van *Orla-Jensen*.) Verreweg de meeste voedingsbodems maken het niet mogelijk aan den vorm, de grootte of de wijze van groei der koloniën te zien met welke van beide bacteriesoorten men te maken heeft. *Orla-Jensen* c.s.¹²⁾ beschrijven dan ook hun vergeefsche pogingen om betacoccen naast streptococcen te onderscheiden. Het ligt voor de hand gebruik te willen maken van het verschil in zuurvormend vermogen der bacteriesoorten door een indicator als lakmoes toe te voegen, welke in vloeistofmilieu zeer goed bruikbaar is voor de herkenning van erin geënte koloniën, maar deze blijkt onbruikbaar te zijn. *Orla-Jensen* trachtte ook een voedingsbodem samen te stellen, waarin betacoccen zich goed, streptococcen zich slecht zouden ontwikkelen, door gebruik te maken van de omstandigheid dat streptococcen geen, betacoccen als regel wel saccharose vergisten, maar had hiermede geen succes. Nu heb ik allereerst getracht voor de differentiatie gebruik te maken van een indicator, toegevoegd aan een kleurlozen, vasten voedingsbodem. Eerst werd lakmoes gebruikt, dit gaf niet de gewenschte resultaten. Daarna werden, toegevoegd aan melkpoederagar, een aantal verschillende indicatoren gebruikt, welke een omslag geven in de buurt van pH 5,0, de streptococcen verzuren het medium tot veel lagere waarden (beneden pH 4,0), terwijl de betacoccen meestal daarboven blijven. Aanvankelijk leek het of methylrood bruikbaar zou zijn, maar omdat dit slechts zelden het geval was, werd later van

het gebruik van indicatoren voor de differentiatie van streptococci en betacocci in vaste voedingsbodems afgezien.

Voor de *isolatie* van de betacocci werd meestal gebruik gemaakt van wei-gistautolysaatagar (w.g.a.a.), bereid volgens voorschrift van *Knudsen* en *Sørensen* (l.c.). Uit foto 3 blijkt, dat de koloniën alle ongeveer even groot zijn en gelijk gevormd, zoowel die der streptococci als die der betacocci. Voor de directe differentiatie is deze voedingsbodem dus onbruikbaar. Wel bleek tenslotte bruikbaar te zijn de voedingsbodem, voorgesteld door *Ayers* en *Mudge*¹³), nl. melkpoederagar (m.p.a.) en wel het medium „A.”

BEREIDING VAN DEN VOEDINGSBODEM.

Bestanddeelen voor 1 liter voedingsbodem:

- | | | |
|-----|--|--|
| (a) | $\left\{ \begin{array}{l} 5 \text{ g. ondermelkpoeder} \\ 1 \text{ g. sec. natriumphosfaat} \\ (\text{Sørensen's fosfaat, Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}) \end{array} \right\}$ | $\left\{ \begin{array}{l} \text{in } 250 \text{ cm}^3 \\ \text{gedest. water,} \end{array} \right\}$ |
| (b) | $\left\{ \begin{array}{l} 3 \text{ g. extract} \\ 5 \text{ g. pepton} \end{array} \right\}$ | in 250 cm ³ gedest. water. |

Meng (a) en (b) en voeg 500 cm³ uitgewassen agar van dubbele sterkte (3 %) toe.

Voorschrift voor de bereiding van 1 liter voedingsbodem.

(a) MELKPOEDEROPLOSSING.

Dit voorschrift moet nauwkeurig worden uitgevoerd!

Men heeft nodig melkpoeder, verkregen volgens het Krause („spray”) -procédé en maakt hiermee de volgende oplossingen:

- (1) 5 g. ondermelkpoeder
20 cm³ gedest. water
- (2) 1 g. Sørensen's fosfaat
5 cm³ gedest. water

Men brengt 5 g. melkpoeder in 20 cm³ koud, gedest. water in een klein bekglas. Roert om totdat alles goed is opgelost. In een ander bekglasje lost men onder zachte verwarming 1 g. Sørensen's fosfaat op in 5 cm³ gedest. water, voegt dan de fosfaatoplossing (2) bij de melkpoederoplossing (1). Het bekglas met het mengsel van (1) en (2) wordt in een waterbad met water van 30° C. geplaatst en gedurende ongeveer 10 minuten tot ongeveer 60° C. verwarmd. De verwarming wordt voortgezet, totdat een neerslag ontstaat, dan wordt in een stoombad verder verwarmd, tot het neerslag wit is. De oplossing wordt met een derde gedest. water verdund en opnieuw 5 minuten verwarmd. Dan decanteeren op filterpapier (eerst de vloeistof) en nawassen met weinig gedest. water. Filtraat aanvullen tot 250 cm³. Dat geeft oplossing (a).

(b) PEPTONEXTRACTOPLOSSING.

Los 5 g. pepton op in gedest. water (of bij gebruik van de oplossing volgens voorschrift van ORLA-JENSEN: neem zooveel van de caseinepepton-oplossing, dat het N-gehalte van den voedingsbodem gelijk wordt aan het gehalte, dat men verkrijgt bij gebruik van vaste pepton) en 3 g. Liebig-extract en vul aan tot 100 cm³, verwarm 20 minuten in stoom. Filtreer totdat filtraat helder wit is en vul aan tot 250 cm³. Dat geeft oplossing (b).

De oplossingen (a) en (b) worden gemengd, aldus krijgt men 500 cm³. Hierbij voegt men 500 cm³ uitgewasschen agar van dubbele sterkte (3 %).

Merkwaardig is, dat op dezen voedingsbodem zooveel koloniën opkomen, ongeveer drie maal zooveel als op de wei-gistautolysaat-agar. (Foto 3, w.g.a.a., verdunning 1 : 1,3 miljoen; foto 4, m.p.a., verd. 1 : 4,2 mill.; aantallen koloniën op beide platen ongeveer gelijk, uitgezaaid is van eenzelfde zuursel, ouderdom van beide platen gelijk, beide bij 25° C. bebroed.) Verder blijkt dat, wanneer wij een uitzaaiing maken *in* melkpoederagar van een cultuur, welke zoowel streptococcen als betacoccen bevat, dat een aantal — meestal de meerderheid — der koloniën en als regel de grootste, omgeven is door een troebeling, een „halo”, terwijl de rest van de koloniën — als regel de kleinere — geen troebeling van het de koloniën omgevende milieu veroorzaakt. Op foto 4 (m.p.a.) is het grootste aantal koloniën omgeven door een „halo”, enkele kleinere koloniën zijn zonder „halo”; bij foto 3 (w.g.a.a.) is van een troebeling bij geen enkele kolonie iets te bespeuren. Wanneer wij deze koloniën nader onderzoeken, door een aantal ervan over te brengen in lakmoesmelk, dan blijkt, dat de melk, geënt met een „halo”-vormende kolonie, binnen twee etmalen gestremd is, terwijl de lakmoes is gereduceerd; de overige, niet-„halo”-vormende, koloniën veranderen de lakmoesmelk nauwelijks, de eenige waarneembare verandering is een zeer geringe kleursomslag van de lakmoes naar rood. Hieruit volgt dat de eerste koloniën, met „halo”, bestaan uit streptococcen, de andere, zonder „halo” uit betacoccen. Blijkbaar heeft de door de streptococcen gevormde groote hoeveelheid zuur de troebelingen veroorzaakt, waarschijnlijk door uitvlokking van de oorspronkelijk in opgeloste toestand aanwezige eiwitten. Reeds door *Beijerinck*¹⁴⁾ werd dit verschijnsel bij andere zuurvormende bacteriën waargenomen en beschreven als het albumosephenomeen.

Het is nu gebleken, dat voor een goede differentiatie door den voedingsbodem het van het hoogste belang is te zorgen voor een juiste samenstelling en bereiding en wel bleek, dat vooral de aard van de gebruikte pepton van beslissenden invloed was. Alléén bruikbaar blijken die peptonen te zijn, welke bereid zijn uit caseïne. Van twee in den handel verkrijgbare caseïnepeptonsoorten, die van Merck en de bactotrypton van Difco geeft de eerste nog de beste resultaten. Deze werden evenwel overtroffen door de uitkomsten, verkregen met zelfvervaardigde caseïnepepton, bereid volgens voorschrift van *Orla-Jensen*¹⁵⁾. Bij deze bereiding werd zorggedragen, dat het stikstofgehalte van den voedingsbodem gelijk werd aan het gehalte, dat wordt verkregen wanneer gebruik wordt gemaakt van vaste handelspepton in de door *Ayers* en *Mudge* opgegeven concentratie. Het N-gehalte van de vaste peptonen bedraagt ongeveer 14%, de oplossing, verkregen volgens de bereidingsmethode van *Orla-Jensen* bevat ongeveer 1% stikstof. De gebruikte agar is volgens voorschrift van *Ayers* en *Mudge* 1,5% uitgewasschen agar. Voor dit doel blijkt, dat het eerder beter is iets minder dan iets meer agar te gebruiken, dan is voorgeschreven. De pH van den voedingsbodem vóór sterilisatie was ongeveer 7,0. Een hogere pH bleek zeer nadeelig te zijn voor de ontwikkeling der melkzuurbacteriën. Aanvankelijk werd verwacht, dat een iets hogere pH voor een scherpe differentiatie gunstig zou zijn, om bovenvermelde reden is deze wijziging echter niet gewenscht. Bovendien moet de voedingsbodem in zoo versch mögelijken toestand worden gebruikt, na 3 à 4 weken is het medium voor een behoorlijke differentiatie niet meer bruikbaar.

Er moet tevens de nadruk op worden gelegd, dat tengevolge van het geringe agargehalte deze voedingsbodem zoo zacht is, dat het ondoelmatig is er strijkcultures op te maken.

De bruikbaarheid van den voedingsbodem in den vermeldden vorm en samenstelling moge blijken uit het volgende:

a) Van een fabrieksboterzuursel werd na sterke verdunning een uitzaaiing gemaakt in melkpoederagar. (Zie foto 4.) Is de verdunning groot genoeg gekozen, dan valt onmiddellijk uit te maken, welke van de opgekomen koloniën een „halo” vormen en welke niet. Is het aantal koloniën te groot, dan worden geheele troebele velden gevormd, waarin eventueel nog niet-„halo”-vormende koloniën verborgen kunnen zijn, welke niet

als zoodanig kunnen worden herkend. Een twintigtal koloniën — zoowel met als zonder „halo” — werd uit de agar genomen en overgebracht in lakmoesmelk en op de boven beschreven manier nader onderzocht. Zonder uitzondering bleken de „halo”-vormende koloniën te bestaan uit streptococcen, terwijl de niet-„halo”-vormende van betacoccen afkomstig bleken te zijn.

b) Van een tiental reinkultures in melk van streptococcen werd in dezelfde melkpoederagar een uitzaaiing gemaakt. Alle opgekomen koloniën vormden „halo's”. (Foto's 5 en 6.)

c) Van een tiental reinkultures van betacoccen werd eveneens in dezelfde melkpoederagar een uitzaaiing gemaakt. Geen enkele van de koloniën vertoont een troebeling. (De schijnbare troebelingen bij enkele koloniën zijn van tegen het glas gedrukte koloniën afkomstig.) (Foto's 7 en 8.)

Uit de foto's blijkt duidelijk het groote verschil in groei tusschen streptococcen en betacoccen in eenzelfde medium. De platen zijn alle ongeveer even oud en bij 25° C. bebroed geweest. Zijn verschillende streptococcenkoloniën dicht bij elkaar, dan worden zij gezamenlijk door een troebeling omgeven, onder omstandigheden wordt de geheele plaat troebel. Alle koloniën van streptococcen zijn lens tot bolvormig, die der betacoccen hebben een soms minder regelmatige vorm en geven dan soms den indruk van twee onderling in loodrechte richting dooreengegroeide.

Met behulp van dezen voedingsbodem is het mogelijk direct de samenstelling van een boterzuursel van de plaat af te lezen. De afzonderlijke koloniën behoeven niet nader te worden onderzocht.

Tenslotte wil ik niet nalaten *prof. dr. A. J. Kluyver* mijn dank te betuigen voor zijn waardevolle raadgevingen en evenzoo de *Fa. B. Veth & Co.* voor het afstaan van haar boterzuursels.

Samenvatting.

Na een algemeene bespreking van de bacteriënfloora van boterzuursels wordt een methode aan de hand gedaan om streptococcen en betacoccen te differentieeren door eenvoudige uitzaaiing in een vasten voedingsbodem.

Bijvoegsel. Beschrijving der afbeeldingen.

- Afb. 1. *Betacoccus cremoris*. Reincultuur in melk. Kleuring volgens Gram. Vergr. ongeveer 1800 \times .
- Afb. 2. *Betacoccus cremoris*. Als bij afb. 2.
- Afb. 3. Uitzaaiing van een fabrieksboterzuursel in wei-gist-autolysaat-agar. (verd. 1 : 1,3 mill.)
- Afb. 4. Uitzaaiing van hetzelfde zuursel in melkpoederagar. (verd. 1 : 4,2 mill.)
- Afb. 5. *Streptococcus lactis*, reincultuur. Uitzaaiing in melkpoederagar.
- Afb. 6. *Streptococcus lactis*, als in afb. 5.
- Afb. 7. *Betacoccus cremoris*, reincultuur. Uitzaaiing in melkpoederagar.
- Afb. 8. *Betacoccus cremoris*, als in afb. 7.

LITERATUUR.

¹⁾ F. W. J. Boekhout, Aromavormers bij de roomzuring, Vereeniging tot Exploitatie eener Proefzuivelboerderij te Hoorn. Verslag over het jaar 1917.

²⁾ F. W. J. Boekhout und J. J. Ott de Vries, Aromabildner bei der Rahmsäuerung, Centralbl. f. Bakt. II, 49, 373, (1919).

³⁾ V. Storch, Fortsatte Undersøgelser over Fremstillinger af Syrevaekkere, 102 Beretning fra Forsøgslaboratoriet, København, 1919.

⁴⁾ B. W. Hammer c.s., Iowa Agric. Exp. Station, Research Bull. 55, 63, 65, 66, 67, 80, 81, (1919—1923).

⁵⁾ S. Orla-Jensen, A. D. Orla-Jensen et B. Spur, Les bactéries d'arome du beurre, Le Lait, 6, 161, (1926); id. J. of Bact. 12, 333, (1926).

⁶⁾ S. Knudsen og A. Sørensen, Bidrag til Syrevaekkernes Bakteriologi, Kgl. Veterinaer- og Landbohøjskole, Aarsskrift, 1929, 64; id. Centralbl. f. Bakt. II, 79, 75, (1929).

⁷⁾ F. W. J. Boekhout en J. van Beynum, Aromabacteriën en botergebreken, Versl. v. landbouwk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations, 32, 415, (1927).

⁸⁾ J. van Beynum, Aromavorming door boteraromabacteriën, ibid. 40, 355, (1934).

⁹⁾ S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria, København, 1919.

¹⁰⁾ Zie: D. H. Bergey, Manual of determinative Bacteriology, Baltimore, 1934.

¹¹⁾ o.m. C. B. van Niel A. J. Kluyver und H. G. Derx, Über das Butteraroma, Bioch. Z. 210, 234, (1929).

¹²⁾ S. Orla-Jensen, A. D. Orla-Jensen et B. Spur, l.c.

¹³⁾ S. H. Ayers and C. S. Mudge, J. of Bact. 5, 565, (1920).

¹⁴⁾ M. W. Beijerinck, Verzamelde Geschriften, V, blz. 52.

¹⁵⁾ S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria, p. 6.

Gonococcensepsis met meningitis gonococcica bij blennorrhoea neonatorum

DOOR

Mej. Dr. J. C. H. BROEK

Bacterioloog.

Op 29 Augustus 1935 ontvingen wij ter onderzoek van *Dr. Carstens*, kinderarts te Utrecht, etter uit de conjunctivaalzak en lumbaalvocht van Johan X, een zuigeling van 20 dagen. Dit kindje werd door Dr. C. behandeld voor een sepsis met meningitis ten gevolge van blennorrhoea neonatorum. De kliniek van dit ziektegeval is door hem uitvoerig beschreven in het Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde, Dl. 80 No. II 1936, blz. 1736, waarnaar hier verwezen kan worden.

Vermelding verdient, dat dit, voor zoover ons bekend, het eenige geval dezer complicatie der blennorrhoea neonatorum is, waarbij het patiëntje genas.

Bacteriologisch-Serologisch onderzoek.

Van lumbaalvocht-sediment en oogpus werden culturen aangelegd op bouillon-, ascites-, bloed- en Levinthal-ascites-agarplaten, terwijl tevens van beide substanties uitstrijkpraeparaten werden gemaakt. In de laatste, gekleurd volgens Gram, vonden wij een groot aantal Gramnegatieve diplococcen, voor het overgrote deel intracellulair liggend. Deze coccen hadden de voor gonococcen typische nier-vorm; ook viel ons op, dat in vele leucocyten de diplococcen bijzonder talrijk waren.

Na 24 uur bebroeden bij 37° C was op de agarplaten géén groei te zien, terwijl de eiwithoudende bodems slechts zeer spaarzame groei van puntvormige koloniën vertoonden, welke na 48 uur bebroeden uitgroeiden tot grauwwitte, vochtig-glan-

zende koloniën. Deze bleken te bestaan uit Gramnegatieve diplococcen.

De eerste overzettingen van deze culturen uit oogpus en lumbaalvocht — op ascites-agar-buizen met veel condenswater — groeiden niet snel en niet overvloedig; na eenige dagelijksche overzettingen werd echter aanpassing van de stammen bereikt, zoodat sinds dien op genoemde voedingsbodem rijke culturen werden verkregen.

Bij overenting van de culturen op bouillon-agar werd geen groei geconstateerd; hetzelfde negatieve resultaat volgde na bebroeden van beënte ascites-agar-buizen bij 22° C.

Van de verkregen diplococcen-stammen werd de suiker- en manniet-omzetting bestudeerd door enting op de „Lingelsheim-reeks”, nl. ascites-agar, die respectievelijk 1% bevat van glucose, lactose, maltose, saccharose en manniet.

De door ons gekweekte stammen bleken uitsluitend glucose om te zetten onder zuurvorming.

Op grond van de beschreven morphologische, cultureele en biochemische eigenschappen verklaarden wij deze, uit oogpus en lumbaalvocht verkregen stammen, voor gonococcen.

Den 3den September ontvingen wij in het laboratorium nogmaals conjunctivaal-pus ter onderzoek.

Ook hierin werden wederom, zoowel in uitstrijkpraeparaten als na kweken, diplococcen gevonden, die voorkomen en eigenschappen van gonococcen vertoonden.

Op latere tijdstippen werden door ons tevens bij herhaling de door één onzer (C.) verkregen punctaten onderzocht en wel subduraal vocht en vocht uit linker- en rechterhersenventrikel. In al deze min of meer troebele vloeistoffen werden gonococcen gevonden. Een uitzondering hierop vormde rechter-ventrikelvocht, hetgeen wij op 16 Nov. ontvingen, dus bijna 10 weken na het begin van de ziekte. Hierin konden nòch microscopisch, nòch cultureel gonococcen aangetoond worden. Eiwitreactie positief; leucocytosis.

Ná dezen datum werden geen puncties meer verricht.

Vermelden wij nog onderzoek van bloed van den patiënt, hetgeen wij op 26 Nov. '35 ontvingen en waaruit wij geen microben konden kweken.

Met het serum werden serologische proeven gedaan, waarover later.

Daar in de literatuur slechts weinig gevallen van gonococcen-meningitis volledig beschreven zijn, leek het ons van belang dit ziektegeval ook serologisch te bestudeeren. Daartoe werden agglutinatie-proeven en complementbindingsreacties verricht.

Agglutinatie.

Van een 48 u. oude gonococcen-cultuur (stam van Johan X) op ascites-agar werd een emulsie gemaakt in physiologisch water; deze dik-troebele vloeistof werd 1 uur geschud in de schudmachine en daarna gefiltreerd door grof filtreerpapier ter verwijdering van grove deeltjes.

Van deze emulsie werd 1 druppel gebracht bij een reeks buisjes met verdunningen van anti-gonococcen-paardenserum, waarna de buisjes in de broedstoof van 45° C werden geplaatst. Na 24 u. werd de reactie afgelezen.

Ter contrôle werd steeds dezelfde reactie ingezet met gelijkelijk behandelde gonococcen- en meningococcen-stammen uit de verzameling van het Instituut (gonococ 1437 en meningococcen 1, 2, A. 2273 en A. 2280).

Tevens werden deze agglutinatie-reeksen nog ingezet met anti-meningococcen-paardenserum en met het serum van Johan X.

De uitkomsten van dit onderzoek zijn in onderstaande tabel 1 verzameld.

TABEL 1. Agglutinatie.

Sera ↓	Stammen →					
	Gonococ 1437 R. S. I.	Gonococ Johan X	Meningo- coc A. 2:80	Meningo- coc A. 2273	Meningo- coc 1 R. S. I.	Meningo- coc 2 R. S. I.
Anti-meningococcen serum equi R. S. I.	$\frac{1}{200}$ zw. +	$\frac{1}{200}$ zw. +	$\frac{1}{400}$ zw. +	$\frac{1}{1600}$ zw. +	$\frac{1}{800}$ +	$\frac{1}{1600}$ zw. +
Anti-gonococcen serum equi R. S. I.	$\frac{1}{800}$ zw. +	$\frac{1}{1600}$ +	neg.	$\frac{1}{100}$ zw. +	$\frac{1}{1600}$ +	$\frac{1}{100}$ zw. +
Serum van Johan X	neg.	neg.	neg.	—	—	—

Hieruit blijkt, dat in het patiëntenserum geen agglutinen konden worden aangetoond, nòch t.o.v. de eigen stam, nòch t.o.v. die uit de verzameling.

De stam Johan X wordt door antigonococcenserum geagglutineerd tot een titer van 1/1600; daar echter meningococ 1 even sterk geagglutineerd wordt in dit serum, kan hieraan geen specifieke waarde toegekend worden.

Bovendien blijkt ook hier weer de, zij het ook zwakke, agglutinatatie van gonococcen in antimeningococcen-serum, hetgeen des te verwarrender is, waar ook de meningococ dikwijls moeilijk tot duidelijke agglutinatatie is te brengen in het homologe serum.

Naar onze meening is dan ook de agglutinatatie van gonococcen met Stock-sera, althans op deze wijze toegepast, onbruikbaar voor nadere identificatie van gonococcen en dientengevolge ongeschikt voor differentiatie van gonococcen en meningococcen.

In de literatuur zijn de meeningen over de specificiteit van de agglutinatatie-reactie en haar waarde als diagnostisch hulpmiddel nog steeds verdeeld. De meeste onderzoekers hechten echter meer waarde aan de complementbindingsreactie van *Müller* en *Oppenheim* (1906), daar zij deze specifiek achten, terwijl onderzoek naar agglutinenen steeds de hinderlijke verschijnselen van groep-agglutinatatie doet zien.

Reeds *Vannod*¹⁾, die een vergelijkende studie van deze twee serologische reacties maakte, kwam tot deze conclusie.

Complementbindingsreactie.

Het leek ons van belang ook deze reactie in ons onderzoek te betrekken.

Daar wij op 26 Nov. bloed van het patiëntje ontvingen en het kind vóór dien datum gedurende 1 week (16 Sept.—23 Sept.) behandeld was met anti-gonococcen-vaccin, kon aan een eventuele vondst van antistoffen in het bloedserum geen diagnostische waarde toegekend worden.

Wij bedienden ons dan ook uitsluitend van deze reactie ter nadere identificatie van de door ons uit de patiënt gekweekte stammen.

Antigeen.

Wij gebruikten 3 antigenen en wel:

- a. Gonococcenvaccin R.S.I.

b. Stam Johan X, uit subduraal vocht gekweekt.

c. Meningococ A. 2273.

Antigeen b. en antigeen c. werden bereid als beschreven bij de agglutinatie, met dit verschil, dat wij de geschudde suspensie 24 u. in de ijskast lieten staan en daarna de bovenste laag afpipeteerden en verdunden tot op de gewenschte troebelheid.

Serum:

Drie sera werden gebruikt, en wel:

1e. Serum van een gonorrhoe-patiënt.

2e. Serum Johan X.

3e. Antimeningococcen-serum R.S.I.

Ter inactivering werden deze sera $\frac{1}{2}$ uur verhit op 56° C.

Voor de overige reagentia en techniek verwijzen wij naar het proefschrift van *J. J. Zoon* (2).

In onderstaande tabel 2 zijn de positieve en negatieve uitslagen van de reactie verzameld, die het serologisch bewijs leveren, dat de door ons uit subduraal vocht gekweekte diplococci gonococci zijn.

TABEL 2. Complementbinding.

Sera ↓	Antigeen →	Gonococci vaccin	Gonococ Johan X	Meningococ A. 2273
Positief gonococci serum . . .		+	+	—
Serum van Johan X		+	+	—
Anti-meningococci serum equi R. S. I.		zw. +	—	+

Beschouwingen.

In een literatuur-overzicht over gonococci-meningitis van *Bradford* en *Kelley* (6) noemen deze 10 gevallen, waarin de gonococ de bewezen oorzaak is van de meningitis, benevens 10 andere, waarin dit bewijs niet volledig geleverd is.

Onder deze eerste 10 gevallen zijn er 3 waargenomen bij pasgeboren kinderen, nl. door *Dundas* (3), *Schall* (4) en *Bradford* en *Kelley*.

Dundas' diagnose is pas vastgesteld bij de sectie, waarbij hij verband constateerde tusschen ophtalmie en meningitis; bacteriologisch bewijs voor de juistheid van zijn waarneming ontbreekt.

Schall beschrijft het geval van een pasgeboren kind, dat aan meningitis sterft na een orbitaal absces. Uitstrijkpraeparaten van de absces-pus vertoonden gonococ-achtige organismen, doch in cultuur werd slechts staphylococcus aureus verkregen. In uitstrijkpraeparaten van het etterige lumbaalvocht werden Gramnegatieve diplococcen gevonden, maar de aangelegde culturen bleven negatief. Voor autopsie werd geen toestemming verkregen.

Bradford en *Kelley* beschrijven een geval van ophtalmia neonatorum, wat zich 2 dagen na de geboorte openbaarde. In de pus werden Gramnegatieve diplococcen gevonden. Vanaf de 6de levensdag werd het kind zieker, kreeg koorts, leucocytosis, gewrichtsontsteking en meningitis en stierf op de 41ste dag.

Uit het lumbaalvocht werden Gramnegatieve diplococcen gekweekt, die morphologisch en cultureel gonococcen bleken te zijn.

Agglutinatie van de verkregen stam in een polyvalent anti-meningococcenserum was negatief. Antigonococcenserum konden de schrijvers zich niet verschaffen.

Complementbindingsreactie werd niet verricht.

Volgens schrijvers bezat de door hen geïsoleerde diplococ de morphologische, culturele, biochemische en agglutinatorische eigenschappen van de gonococ.

Wat het serologisch onderzoek betreft acht ik deze uitspraak onjuist, gezien de vaak slechte agglutineerbaarheid van de meningococ in homoloog serum.

Betreffende de 20 gevallen van gonococcen-meningitis, door *Bradford* en *Kelley* uit de literatuur sinds 1905 verzameld, kan men opmerken, dat slechts in één geval het 5-ledig bewijs voor gonococcen-infectie werd geleverd (morphologie, cultuur, suikervergisting, agglutinatie, complementbinding) en wel door *Strumia* en *Kohlhas* (5).

Positieve complementbindingsreactie door patiënten-materiaal werd slechts in 2 gevallen bericht; deze onderzoekers bepaalden echter niet de suikervergisting.

In 4 gevallen wordt de uitslag van het agglutinatie-onderzoek positief voor gonococcen geacht bij negatieve agglutinatatie van de patiëntenstam in antimeningococcenserum, hetgeen ik om bovengenoemde reden onjuist acht.

In 2 gevallen geeft de gekweekte gonococcenstam een positieve agglutinatatie met antigonococcen-serum, terwijl eveneens in 2 gevallen een positieve agglutinatatie van de gekweekte stam in het overeenkomstige patiëntenserum bericht wordt.

Het sporadisch voorkomen van de genoemde complicaties en de weinig volledige beschrijvingen daaromtrent in de literatuur deden ons besluiten tot een uitgebreid onderzoek van dit patiëntenmateriaal en de publicatie daarvan.

Samenvatting:

Een geval van gonococcen-meningitis bij neonatorum wordt beschreven, volgende op ophtalmia neonatorum, waarbij de aanwezigheid van de gonococ in het patiëntenmateriaal (oogpus, lumbaal-, ventrikel- en subduraal vocht) wordt vastgesteld door de morphologische, cultureele en biochemische eigenschappen van deze microbe, alsmede door agglutinatatie- en complement-bindingsreactie.

In tegenstelling met 3 van dergelijke ziektegevallen uit de literatuur bleef deze zuigeling in leven.

Résumé:

L'auteur a décrit un cas de septicémie gonococcique avec méningite suppurée à gonocoques, précédée d'une ophtalmie blennorragique, où la présence de ce germe dans le pus et dans le liquide céphalo-rachidien a été prouvée par moyen de la morphologie, la culture, la fermentation du milieu glucosé, l'agglutination et la séroréaction blennorragique.

Contrairement aux trois cas de blennorragie des nouveau-nés, mentionnés depuis 1905, ce nourrisson-ci est guéri.

Zusammenfassung:

Verfasser beschreibt einen Fall von Gonokokken-meningitis und -sepsis nach Blennorrhöa neonatorum bei einem Neugeborenen, wobei durch die morphologischen, kulturellen und

biochemischen Eigenschaften des Gonokokkus, sowie durch Agglutination und Komplementbindungsreaktion das Vorhandensein von Gonokokken im Liquor festgestellt wird.

Im Gegensatz zu drei ähnlichen in der Litteratur beschriebenen Fällen bei Säuglingen, wobei der Patient einging, blieb dieses Kind leben.

Summary:

The author describes a case of gonococcal conjunctivitis in a new-born infant, followed by gonococcal septicaemia and -meningitis, wherein the presence of the gonococcus is proved by the morphological, cultural and biochemical characters of this micro-organism and also by the agglutination and complement fixation test.

In contrast with three similar cases previously described in literature, this infant recovered.

L I T E R A T U U R.

1. *Vannod, T.:* Über Agglutinine und spezifische Immunkörper in Gonococcenserum.
Dtsch. med. Wchschr. 32, 1906, p. 1984.
 2. *Zoon, J. J.:* Over de complementbindingsreactie bij gonococceninfecties.
Proefschrift. Utrecht 1928.
 3. *Dundas, G. H. G.:* Ophtalmia neonatorum before birth.
Lancet 1, 122, 1921.
 4. *Schall, E.:* Gonorrhöischer Lidasbzes und tödlicher Meningitis nach Gonoblenn. eines Neugeborenen.
Klin. Monatsbl. für Augenheilk. 69, 597, 1922.
 5. *Strumia, M. M. and Kohlhas, J. J.:* Gonococcic Meningitis.
Journ. of Inf. Dis. 1933, 53, p. 212.
 6. *Bradford, W. and Kelley, H.:* Gonococcic Meningitis in a new born infant.
Am. J. of Diseases of Children, vol. 46, p. 543.
-

Eenige serologische bijzonderheden bij klierkoorts ¹⁾

DOOR

Dr. W. J. BRUINS SLOT

Arts te Leiden.

In 1889 beschreef E. Pfeiffer als „klierkoorts” een epidemisch voorkomende infectieziekte, waarvan koorts, acute klierzwellingen aan den hals en vooral in den nek, lever- en miltvergrooting de voornaamste verschijnselen waren. Het ziektebeeld werd later echter anders begrepen en men achtte de „acute idiopathische halsklierontsteking” met de door Pfeiffer beschreven ziekte identiek. Combij beschreef deze halsklierontstekingen, die men tegenwoordig als locale lymphadenitis bij infecties van de neus-keelholte dient op te vatten, in 1894 als „fièvre ganglionnaire”. Zodoende werd het door Pfeiffer beschreven ziektebeeld door velen niet meer als morbus sui generis erkend. Toen in latere jaren morphologisch bloedonderzoek meer werd toegepast, werden op grond van bijzonderheden in het witte bloedbeeld, voornamelijk bij acute anginae, nieuwe ziektebeelden onder verschillende benamingen beschreven: angina met lymphatische reactie (Türck 1907), monocytën-angina (Schultz 1922), infectieuze mononucleose, welke naam in de Engelsch-Amerikaansche literatuur het meeste gebruikt wordt. Schultz sprak later van „lymphoid-zellige” angina. Pas in de laatste jaren is men van meening geworden, dat al deze ziektebeelden identiek zijn en met groote waarschijnlijkheid door Pfeiffer bedoeld waren bij zijn

¹⁾ Dr. G. Korthof wil ik hartelijk danken voor zijn medewerking, waardoor het mij mogelijk werd dit onderzoek op het Klinisch Laboratorium te bewerken.

beschrijving der klierkoorts. Twijfel over dit laatste is echter wel gerechtvaardigd. Daar echter in de Europeesche literatuur de naam „klierkoorts” geheel is ingeburgerd, zal deze naam in hetgeen volgt, worden gebezigd.

Dat de ziekte door de haematologen onder zooveel verschillende benamingen is beschreven, vindt zijn verklaring in de bijzonderheden van het witte bloedbeeld. Zooals bekend, wordt deze aandoening gekenmerkt door een duidelijke relatieve en absolute mononucleose, die meestal 60—90% der witte bloedcellen bedraagt. Naast kleine en groote lymphocyten komen er veel lymphocytachtige cellen voor met sterk basophil protoplasma, die als het ware allerlei overgangen vormen naar echte plasmacellen. Downey wees daarentegen op de gelijkenis dezer cellen met monocyten: hij sprak daarom van monocytoïede cellen. Onrijpe jonge lymphocyten en lymphoblasten komen voor, doch zijn zeldzaam. Het beste kan men dit bloedbeeld karakteriseeren door het een „bont bloedbeeld” te noemen. Ditzelfde bonte beeld werd zeer onlangs door Downey en Stasney ook beschreven in tijdens de ziekte geëxstirpeerde lymphklieren.

De in het bloed aanwezige neutrophiele leucocyten vertoonen meestal een matige linksverschuiving en toxische correling. Het totale aantal witte bloedcellen bedraagt meestal 10.000 à 20.000 per mM^3 , kan echter tot 50.000 of hoger stijgen. In de eerste dagen der ziekte wordt dikwerf een leucopenie vastgesteld. Glanzmann, Lehndorff en Schwarz gaven in monographieën een zeer uitgebreide beschrijving van de symptomatologie en het klinische verloop der klierkoorts. In de Nederlandsche literatuur is de publicatie van Minkenhof zeer vermeldenswaard.

In 1932 werd door Paul en Bunnell als nieuw symptoom der „infectieuze mononucleose” beschreven, dat het bloedserum der patiënten schapenbloedlichaampjes tot in hooge verdunningen agglutineert. Reeds vóórdien hadden Hanganutziu en Deicher gevonden, dat zich bij patiënten die met paardenserum zijn ingespoten, agglutinininen, o.a. voor schapenerythrocyten ontwikkelden, terwijl Davidsohn in deze gevallen een hoogen titer vond, wanneer de patiënten na de paardenseruminjectie serumziekte hadden doorgemaakt. Deze reactie van Paul en Bunnell is door talrijke onderzoekers bevestigd, tal-

looze contrôle-reacties bij allerlei aandoeningen zijn reeds verricht. De meest gebruikelijke techniek der reactie is die van Davidsohn, waarbij $\frac{1}{2}$ cc. verdund bloedserum, 1 cc. physiologisch water en $\frac{1}{2}$ cc. 2% schapenbloed-suspensie tezamen worden gebracht, daarna 2 uur in de broedstoof bij 37° en dan tot den volgenden dag in de ijskast worden geplaatst. Zeer vele schrijvers geven als titer de verdunning op, waartoe het serum verdund was vóór de toevoeging van het physiologische water en de bloedcellen-suspensie. Ik meen, dat dit onjuist is.

Ook Stuart, Burgess, Lawson en Wellman zijn van oordeel, dat men de totale verdunning van het serum als titer dient op te geven. Zij wijzen tevens op de zeer groote beteekenis der gevolgde techniek. In hetgeen volgt wordt de waarde der *totale* verdunning als titerwaarde opgegeven.

Bij normale personen, bij allerlei bloedziekten en infectieziekten, bij anginae die niet tot de groep der klierkoorts behoren, wordt de agglutinatie der schapenbloedlichaamjes hoogstens in een serumverdunning van 1 : 128 gezien. Meestal worden lagere verdunningen als uiterste grens gevonden. Bij serumziekte kan de agglutinatie nog in een verdunning van 1 : 512 (Bernstein) positief zijn. De agglutinatie bij klierkoorts echter kan zelfs in verdunningen van 1 : 8000, of nog hoger, positief zijn. Dat de reactie van Paul en Bunnell geheel specifiek zou zijn, is *à priori* niet te verwachten. Bernstein o.a. beschreef eenige gevallen, waarbij de titer niet verhoogd was, terwijl daarentegen bij een geval van aleukaemische leukaemie of aleukie(?) door Paul en Bunnell een titer 1 : 512 en bij een patiënt met purpura haemorrhagica door Bernstein een titer 1 : 1024 (4096?) werd gevonden.

Reeds Paul en Bunnell wezen er op, dat bij de klierkoorts, parallel met de vorming van agglutininen, tevens haemolysinen voor schapenbloed worden gevormd. Zeer vele onderzoekers meenden nu te mogen aannemen, dat deze antilichamen bij de klierkoorts zoogenaamde Forssmansche antilichamen zijn. In 1911 was door Forssman gevonden, dat sera van konijnen, die met suspensies van cavia-organen waren ingespoten, haemolysinen voor schapenbloedlichaampjes bevatten. Cavia-organen bevatten dus een heterophiel of heterogeen antigeen — nu algemeen Forssman-antigeen genoemd — en geven na injectie bij konijnen aanleiding tot de vorming van

heterophiele antilichamen: Forssman-antilichamen. Het Forssman-antigeen komt niet alleen in cavia-organen voor, doch is tevens in organen van eenige andere dieren gevonden, die tezamen de zoogenaamde „cavia-groep” vormen. Behalve het konijn heeft ook een bepaalde groep van andere dieren, de „konijnengroep”, de eigenschap na injecties met suspensies van cavia-organen antilichamen tegenover schapenbloed te vormen. De mensch behoort tot de konijnengroep. Hoewel een dier niet tot cavia-groep en konijnen-groep beide kan behooren, werd merkwaardigerwijze door Schiff en Adelsberger in de bloedlichaampjes der A- en AB-groep van den mensch Forssman-antigeen gevonden.

De belangrijkste eigenschappen der Forssman-antigenen en antilichamen zijn als volgt: ²⁾

- 1°. de Forssman-antilichamen worden in vitro door Forssman-antigenen gebonden. Door adsorptie-proeven met Forssman-antigeen bevattende orgaancellen-suspensie zijn Forssman-antilichamen uit een serum te verwijderen.
- 2°. Alcoholische extracten uit organen der cavia-groep kunnen Forssman-antilichamen binden, geven met Forssman-antilichamen bevattende sera troebelingen (precipitatie-reactie) en binden hierbij tevens complement.
- 3°. Een serum met Forssman-antilichamen bevat niet alleen haemolysinen en agglutininen voor schapenbloed, doch ook voor geitenbloed, daarentegen niet voor runderbloedlichaampjes.
- 4°. Het verschijnsel der „anaphylaxie renversée”: een serum, dat Forssman-antilichamen bevat, is bij inspuiting giftig voor een niet-voorbehandelde cavia, omdat dan bij de cavia antigeen en antilichaam tezamen worden gebracht.
- 5°. Het Forssman-antigeen is thermostabiel.

Het bloedserum van vier patiënten, lijdende aan klierkoorts, kon in het laatste jaar door mij nader onderzocht worden, met het oog op de vraag, of de agglutininen en haemolysinen voor schapenbloedlichaampjes bij deze ziekte al of niet tot de Forssman-antilichamen gerekend moeten worden.

²⁾ Voor een beknopt, doch duidelijk overzicht zie Dr. A. W. Pot, Antonie v. Leeuwenhoek Tijdschrift, deel II, No. 1, 1935.

Beknopte ziektegeschiedenissen:

- Patiënt I.** Man, 21 jaar. Koorts tot 40°. Keelpijn met roode keel, later angina follicularis; weeke halsklieren tot aan de sleutelbeenderen toe. Milt palpabel. Lichte icterus met bilirubinurie. Bloedbeeld: leucocyten 6400, waarvan staafk. 2%, segmentk. 20%, monocytën 3%, plasmacellen 4%, lymphocyten 71% (hieronder zeer vele cellen met donkerblauw protoplasma en overgangen naar plasmacellen).
- Patiënt II.** Man, 26 jaar. Koorts tot 39,5, na 12 dagen angina met vergrootte halsklieren en wederom koorts tot 39,7. Milt palpabel. Bloedbeeld: na 1 week ziekzijn leucocyten 3800, na 12 dagen leucocyten 12.200, waarvan: eosinoph. 1½%, staafk. 3½% segmentk. 15%, plasmacellen 3%, lymphocyten 77% (hieronder zeer vele overgangen tusschen lymphocyten, plasmacellen en kleine monocytën).
- Patiënt III.** Vrouw, 19 jaar. Koorts. Angina met vies-witte beslagen, wegens vermoeden op diphtherie door den huisarts met 40 cc. diphtherieserum ingespoten, later in de barak der afdeeling voor Inwendige geneeskunde (Prof. Dr. W. A. Kuenen) opgenomen. Keelwat: diphtherie negatief. Bloedbeeld: leucocyten 11.700, later leucocyten 6800, waarvan eosinoph. 1%, staafk. 13%, segmentk. 36%, lymphocyten 50% (vele overgangen van lymphocyten tot monocytën en monocytoïde cellen). Reactie van Paul en Bunnell maximaal 1 : 4096 geweest.³⁾
- Patiënt IV.** Vrouw, 23 jaar. Koorts tot 39,9. Geringe vergroo-ting van eenige halsklieren. Naso-pharyngitis. Milt palpabel. Na 1 week ziekzijn leucocyten 11000, waarvan eosinoph. 1%, staafk. 7%, segmentk. 29%, monocytën 5½%, plasmacellen 2%, lymphocyten 53½% (zeer vele cellen met donkerblauw protoplasma, enkele lymphocyten met lymphoblasten-kern en donkerblauw plasma).

³⁾ Op grond van de hooge titer der reactie van Paul en Bunnell en het typische bloedbeeld staat de diagnose „klierkoorts” bij de patiënte, waarvan ik de klinische gegevens dank aan collega D. W. Duyster, wel vast.

Techniek der proeven.

Alle te onderzoeken sera werden 15 min. bij 56° geïnactiveerd.

Onderzoek op agglutininen voor schapenbloed-, geitenbloed- of runderbloedlichaampjes: $\frac{1}{2}$ cc. serumverdunding + 1 cc. fysiologisch water + $\frac{1}{2}$ cc. 2% bloedlichaampjes-suspensie. 2 uur broedstoof bij 37°, daarna ijskast tot volgenden dag. De agglutinatie werd vooral naar den toestand van den rand van het erythrocyten-bezinksel beoordeeld, eventueel door opschudden gecontroleerd.

Onderzoek op haemolysinen: Bij patiënt I en III:

$\frac{1}{2}$ cc. serumverdunding + 1 cc. fysiologisch water + 1 cc. caviacomplement 1 : 30 + $\frac{1}{2}$ cc. 2% bloedlichaampjes-suspensie. Na 1 uur waterbad bij 37° afgelezen.

Bij patiënt IV:

$\frac{1}{2}$ cc. serumverdunding + 1 cc. fysiologisch water + $\frac{1}{2}$ cc. caviacomplement 1 : 10 + $\frac{1}{2}$ cc. 2% bloedlichaampjes-suspensie. Na 1 uur waterbad bij 37° afgelezen.

Bij deze proeven werden tevens willekeurige Wassermann-sera als controle en tevens controles zonder serum ingezet.

Adsorptie-proeven met versche 4% cavianier-suspensie, 4% schapenbloed en 4% runderbloed.

Bij patient I:

- a. adsorptie 1 cc. serum 1 : 33 + 3 cc. 4 % schapenbloed, 1 uur broedstoof 37°.
- b. adsorptie 1 cc. serum 1 : 33 + 3 cc. 4 % cavianier-suspensie, 1 uur broedstoof 37°.
- c. adsorptie $\frac{1}{2}$ cc. onverdund serum + $1\frac{1}{2}$ cc. 4 % schapenbloed, 1 uur broedstoof 37°.
- d. adsorptie $\frac{1}{2}$ cc. onverdund serum + $1\frac{1}{2}$ cc. 4 % cavianier-suspensie, 1 uur broedstoof 37°.
- e. adsorptie $\frac{1}{2}$ cc. serum 1 : 10 + $15\frac{1}{2}$ cc. 4 % schapenbloed, 2 uur broedstoof 37°.
- f. adsorptie 1 cc. serum 1 : 10 + 11,8 cc. 4 % cavianier-suspensie, 2 uur broedstoof 37°.

Bij patient IV:

Als adsorbens gebruikt een deel der bezonken suspensie van de gedurende één nacht in de ijskast bewaarde 4% cavianier-suspensie, 4% schapen- en 4% runderbloedlichaampjes-suspensie. Bovendien als zoodanig gebruikt 4% schapenbloed en 4% runderbloed, dat gedurende 2 uur op kookhitte was

verhit en tot meer dan de helft van het volumen was ingedampt.

$\frac{3}{4}$ cc. serum 1 : 2 + $\frac{3}{4}$ cc. adsorbens, 2 uur waterbad bij 37°, daarna 4 uur ijskast, afcentrifugeeren. Bovenstaande vloeistof wederom met gelijke deelen adsorbens mengen en na 2 uur waterbad afcentrifugeeren. Er werd dus een serumverdunding 1 : 8 na de adsorptie verkregen.

De sera van patiënt I en IV werden na de verschillende adsorptieproeven wederom op het voorkomen van agglutinen en haemolysinen onderzocht.

Complementbindingsreactie: bij patiënt I en II:

5 gram cavianier fijngeknipt en gevoegd bij 25 cc. alcohol absolutus. Telkens geschud. Na 6 dagen gefiltreerd en als antigeen gebruikt.

Bij de voorproef antigeen- en complement-titratie.

Bij de hoofdproef:

In alle buisjes $\frac{1}{2}$ cc. antigeen 1 : 5.

In alle buisjes $\frac{1}{2}$ cc. cavia-complement 1 : 10.

In de verschillende buisjes resp. 0,5- 0,4- 0,3- 0,2- 0,1 cc. serum 1 : 5.

Alle buisjes met physiologisch water tot 1,5 cc. aangevuld.

30 min. waterbad bij 37°, daarna 1 cc. amboceptor (2% schapenbloedlichaampjes met serum van voorbehandeld konijn gesensibiliseerd) toegevoegd.

Na 20 minuten waterbad afgelezen. Bovendien verschillende contrôles ingezet.

Precipitatiereactie: bij patiënt I en II: hetzelfde alcoholische cavianierextract als van de complementbindingsreactie gebruikt. Techniek als van de reactie van Sachs-Georgi.

De resultaten der proeven zijn in tabelvorm weergegeven.

Uit deze tabellen blijkt, dat bij de klierkoorts de verhoogde titer der schapenbloed-agglutinen niet altijd parallel gaat met een relatief even groote vermeerdering der haemolysinen en dat een hoge haemolysinen-titer voor schapenerythrocyten ook in contrôle-sera kan worden gevonden. De agglutinen blijken wel door schapenbloed, doch niet door cavianier te worden geadsorbeerd. Na genezing der ziekte verdwijnen de agglutinen weer spoedig uit het bloed. Men vindt bij klierkoorts geen vermeerdering van agglutinen voor

TABEL I

	Pat. I.	Na adsorptie met schapenbloed Pat. I.	Na adsorptie met cavianier Pat. I.	Contr. serum.
Agglut. schapenbloed nog + . . .	16896 ¹⁾	528 a)	16896 b)	64
Volledige haemolyse schapenbloed .	192	— ²⁾ c)	96 d)	— ²⁾
Haemolysinen schapenbloed nog +	6144	768 c)	6144 d)	384

¹⁾ beteekent titer 1 : 16896.

²⁾ de laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 24.

a), b), c) en d) zijn de verschillende verdunningen der reeds besproken adsorptie-proeven. (Zie blz. 62.)

TABEL II.

	Pat. I.	Na adsorptie met schapenbloed Pat. I.	Na adsorptie met cavianier Pat. I.	Pat. II.	Ruim 1 maand na genezing Pat. II.	Contr. Serum.
Agglut. schapenbloed nog +	32768	512 e)	16384 f)	2048	512	128

e) en f) zijn de verschillende verdunningen der adsorptie-proeven. (Zie blz. 62).

TABEL III

	Pat. III.	Contr. serum ³⁾ .	Contr. serum.
Agglutinatatie schapenbloed nog + . .	1024	256	16
Volledige haemolyse schapenbloed .	96	768 (!)	48
Haemolyse schapenbloed nog + . .	768	6144 (!)	384
Agglutinatatie geitenbloed nog + . .	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾
Volledige haemolyse geitenbloed . .	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾
Haemolyse geitenbloed nog + . . .	384	768	384
Agglutinatatie runderbloed nog + . .	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾
Volledige haemolyse runderbloed . .	48	— ²⁾	— ²⁾
Haemolyse runderbloed nog + . . .	1536	— ²⁾	— ²⁾

¹⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 8.

²⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 24.

³⁾ Dit controle-serum was afkomstig van een lijder aan chronische gonorrhoe.

TABEL IV.

	Pat. I.	Pat. II.	Contr. ¹⁾ serum.
Complementbinding	—	—	zwak +
Precipitatiereactie	—	—	—

¹⁾ Van het controle-serum was de reactie van Wassermann twijfelachtig positief, de reactie van Kahn sterk positief, die van Meinicke positief.

geiten- en runderbloedlichaampjes, evenmin komt een vermeerdering van haemolysinen voor geitenbloed bij klierkoorts voor. Wel blijkt in het bloedserum van klierkoortslidgers een duidelijke vermeerdering te bestaan van runderbloed-haemolysinen. De complementverbindingsreactie en precipitatiereactie met cavianier-extract waren bij twee klierkoortslidgers negatief. Het willekeurig gekozen contrôle-serum vertoonde echter met dit antigeen een zwakke remming: er was toevallig een serum met twijfelachtige reactie van Wassermann en positieve reacties van Kahn en Meinicke gekozen.

Uit het voorgaande volgt, dat de antilichamen bij klierkoorts zeker niet voldoen aan de eischen, die aan Forssman-antilichamen gesteld moeten worden. Alle hypothesen, die in de literatuur zijn gemaakt over den aard van het virus in verband met de aanwezigheid van Forssman-antigeen, zijn dan ook van allen grond ontbloot.

Nadat bovenstaande conclusies reeds waren geformeerd, las ik eenige publicaties, waarin de schrijvers tot dezelfde gevolgtrekking kwamen en waarvan nog eenige bijzonderheden volgen. Bailey en Raffel deden bij klierkoorts vele adsorptieproeven met allerlei suspensies van weefselcellen en bacteries die Forssman-antigeen bevatten, en konden geen adsorptie der antilichamen vaststellen; slechts paardenniercellen en een bepaalde stam van bacillus Welchii vertoonden een duidelijke adsorptie. Bij hun proeven werden de schapenbloed-agglutinenen en -haemolysinen en de ook door hen gevonden runderbloed-haemolysinen bij klierkoorts zoowel door versch schapen- en runderbloed als door gekookt schapen- en runderbloed ge-adsorbeerd. Deze proeven zijn door mij nog eens herhaald en de resultaten in de volgende tabellen vastgelegd:

TABEL V.

	Pat. IV	Contr. serum	Contr. serum	Contr. serum	Contr. serum	Contr. serum
Agglutin. schapenbloed nog + . .	4096	128	64	128	32	32
Volledige haemolyse schapenbloed	640	80	40	160	— ¹⁾	40
Haemolyse schapenbloed nog + .	5120	1280	320	640	— ¹⁾	320
Agglut. runderbloed nog + . . .	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾
Volledige haemolyse runderbloed .	320	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾
Haemolyse runderbloed nog + . .	10240	— ¹⁾	320	— ¹⁾	— ¹⁾	80

¹⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 20.

²⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 16.

TABEL VI.

	Pat. IV	Na adsorptie met schapenbloed	Na adsorptie met gekookt schapenbloed	Na adsorptie met runderbloed	Na adsorptie met gekookt runderbloed	Na adsorptie met caviaan	Contr. serum
		Pat. IV	Pat. IV	Pat. IV	Pat. IV	Pat. IV	
Agglut. schapenbloed nog +	4096	64	1024	256	256	4096	32
Voll. haemolyse schapenbloed	160	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	— ²⁾	80
Haemolyse schapenbloed nog +	5120	— ¹⁾	320	640	2560	1280	640
Voll. haemolyse runderbloed	1280	— ¹⁾	320	— ¹⁾	— ¹⁾	— ¹⁾	160
Haemolyse runderbloed nog +	20480	640	5120	— ¹⁾	— ¹⁾	20480	640

¹⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 80.

²⁾ De laagste verdunning, die wordt ingezet, is 1 : 40.

Bij deze proeven bleken het adsorbeerend vermogen van schapenbloed en runderbloed ongeveer even groot te zijn, doch bleek gekookt runderbloed iets beter te absorbeeren dan gekookt schapenbloed. Schapen- en runderbloedlichaampjes moeten dus beide thermostabiele receptoren bezitten, die de antilichamen bij klierkoorts adsorbeeren. Het adsorbeerend vermogen van runderbloed is wederom een argument, dat deze

antistoffen bij klierkoorts geen Forssman-antilichamen zijn, daar runder-erythrocyten geen Forssman-antigeen bevatten. De thermostabiliteit der adsorbeerende runder- en schapenbloedlichaampjes bewijst, dat men hier ook niet te maken heeft met de thermolabiele isophiele of groepsantigenen dezer erythrocyten (Bailey en Raffel).

Als verder argument, dat bij klierkoorts geen Forssman-antilichamen voorkomen, mag worden vermeld, dat het patiënten-serum voor caviae niet giftig is (Bailey en Raffel, Stuart en medewerkers) en dat patiënten met bloedgroep A net zoo goed als patiënten met andere bloedgroepen een positieve reactie van Paul en Bunnell vertoonen (Stuart en medewerkers, Bernstein).

Daar de haemolysinen en agglutininen voor schapen-erythrocyten in sera van normale personen het Forssman-karakter vertoonen (Forssman), kunnen de antilichamen bij klierkoorts niet door aspecifieke prikkeling of stimulatie tot vermeerderde vorming van normaal aanwezige antilichamen verklaard worden. Dit laatste is echter wel mogelijk bij de verklaring van het ontstaan der agglutininen en haemolysinen voor schapenbloedlichaampjes bij lijders aan serumziekte na paardenserum-injectie, welke antilichamen door Davidsohn door middel van de adsorptie aan suspensies van cavianier als Forssman-antilichamen werden geïdentificeerd, hoewel Deicher het Forssman-karakter der na paardenserum-injectie gevormde agglutininen voor erythrocyten van schaap, paard, konijn, cavia en varken ontkent.

Samenvatting en Conclusie.

- 1°. De hoge agglutininen-titer voor schapen-erythrocyten bij klierkoorts gaat niet volkomen parallel met de vermeerdering van schapenbloedhaemolysinen.
- 2°. Een vermeerdering van agglutininen en haemolysinen voor geitenbloedlichaampjes kan bij klierkoorts niet worden vastgesteld.
- 3°. Men vindt bij klierkoorts een sterke vermeerdering van haemolysinen, niet van agglutininen, voor runder-erythrocyten.
- 4°. De antilichamen bij klierkoorts kunnen door verse en gekookte schapenbloedlichaampjes, door verse en ge-

kookte runder-erythrocyten worden geadsorbeerd. Adsorptie door cavianier-cellen is negatief.

- 5°. De complementbindingsreactie en precipitatiereactie met alcoholisch cavianier-extract waren bij klierkoorts negatief.
- 6°. De agglutinen en haemolysinen bij klierkoorts behooren niet tot de Forssman-groep. Evenmin zijn zij te verklaren door aspecifieke vermeerdering van normaal voorkomende agglutinen en haemolysinen. Een verklaring van hun ontstaan is tot op heden niet mogelijk.

L I T E R A T U U R.

1. Bailey and Raffel, J. Clin. Invest., Vol. XIV, No. 2, 1935.
 2. Bernstein, J. Clin. Invest., Vol. 13, bladz. 419, 1934.
 3. Bunnell, Am. J. Med. Sciences, Vol. 186, 1933.
 4. Comby, *Traité des Maladies de l'enfance*, tome I, p. 346, 1897.
 5. Davidsohn, J. Am. Med. Ass., Vol. 105, No. 10, 1935. Discussie-opmerking.
 6. Deicher, *Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh.*, Band 106. S. 561. 1926.
 8. Forssman, *Handbuch der Path. Mikroorganismen*, Kolle und Wassermann, Bd. III, T. I.
 9. Glanzmann, *Abhandl. Kinderheilk. und Grenzgeb.*, Heft 25, 1930.
 10. Mc. Kinlay, Downey and Stasney, J. Am. Med. Ass., Vol. 105, No. 10, 1935.
 11. Lehdorff und Schwartz, *Ergebn. Inn. Med. und Kinderheilk.*, Bd. 42 en 43.
 12. Minkenhof, *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, No. 32, 1934.
 13. Paul and Bunnell, Am. J. Med. Sciences, Vol. 183, 1932.
 14. Pfeiffer, *Jahrbuch Kinderheilk.*, Bd. 29, S. 257, 1889.
 15. Schiff und Adelsberger, *Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, Bd. 40, 1924.
 16. Schultz und Mirisch, *Virchows Archiv*, Bd. 264, S. 260, 1927.
 17. Stuart, Burgess, Lawson, and Wellman, *Arch. of Int. Med.*, Vol. 54, p. 199, 1934.
- 11 Maart 1936.
-

De verkregen resistentie tegen de bacteriophagaag

DOOR

Dr. R. TH. SCHOLTENS

bacterioloog-seroloog.

Het is een bekend feit, dat in een bouilloncultuur, die door een bacteriophagaag gelyseerd is geweest, na eenigen tijd wederom een cultuur ontstaat. Wanneer men deze cultuur op een agarplaat uitstrijkt, en van aparte kolonies af-ent, blijkt een min of meer groot percentage van de aldus verkregen secundaire cultures resistent te zijn tegen de bacteriophagaag, waarmee de stam in aanraking was geweest.

Ook tegen vele andere bacteriophagen is de stam resistent geworden; sommige bacteriophagen echter tasten de stam nog aan. d'Hérelle gaf hiervan een verklaring door aan te nemen, dat de verkregen resistentie alleen beschermde tegen bacteriophagen, die even sterk of minder sterk waren dan de bacteriophagaag, die de resistentie had teweeg gebracht. Sterkere bacteriophagen zouden de cultuur echter nog wel, ondanks haar verkregen resistentie, kunnen aantasten. Hij geeft echter aan, dat op dezen regel veel uitzonderingen zijn. Dat deze uitzonderingen niet sterker op den voorgrond treden, is toe te schrijven aan het feit, dat er geen goede, algemeen aangenomen maat voor de virulentie van een bacteriophagaag bestaat.

Van twee bacteriophagen, A en B, maakt A een bacteriestam resistent tegen beide bacteriophagen, A en B; B daarentegen wel tegen zichzelf, maar de stam blijft gevoelig voor A. Waar het moeilijk is de sterkte van beide bacteriophagen, vooral wanneer het onderscheid niet groot is, te vergelijken, kan men meestal aannemen, dat de bacteriophagaag A virulenter was dan de bacteriophagaag B. Soms is dit in een dergelijk geval echter niet mogelijk, daar B te duidelijk virulenter voor de gebruikte stam is dan A. Dan is er een geval dat strijdt met de hypothese van d'Hérelle.

Het volgende onderzoek tracht een andere verklaring voor deze feiten te geven, waardoor ook de uitzonderingen, die reeds door d'Hérelle genoemd werden, beter worden begrepen.

De onderstaande proef vormt een nieuwe tegenspraak tegen de hypothese van d'Hérelle en doet tevens een andere hypothese aan de hand.

De resistentie van secundaire cultures van de stam Typhus 1460, verkregen na lysis met de bacteriophagen Ty 5 en Ty-Gä 7 werd vergeleken.

De bacteriophaga Ty 5 was geïsoleerd uit grachtwater met de stam Ty 1460 en was „rein” gemaakt, door drie maal van aparte plagues af te enten. De bacteriophaga Ty-Gä 7 was eveneens uit grachtwater geïsoleerd, evenwel met de Gärtner-stam Gä 13 en had met dezen stam twintig passages doorlopen. Negen van deze passages hadden plaats gevonden op een vasten voedingsbodem, waarbij van aparte plagues werd afgeënt.

De resistentie van de twee secundaire cultures Ty 1460 sec. bact. Ty 5 en Ty 1460 sec. bact. Ty-Gä 7 werd nu onderzocht, tegen beide bacteriophagen Ty 5 en Ty-Gä 7. Dit onderzoek geschiedde door op een met enkele druppels van een bouilloncultuur gelijkmatig beënte agarplaat, de bacteriophaga met een oese over anderhalve centimeter lengte uit te strijken. Was de cultuur gevoelig, dan zag men op het met bacteriophaga beënte gedeelte den volgenden dag een uitsparing.

Het resultaat was, dat de bacteriophaga Ty 5 den stam resistent maakte tegen zichzelf, maar niet tegen de bacteriophaga Ty-Gä 7, en dat de bacteriophaga Ty-Gä 7 de stam resistent maakt tegen zichzelf, maar niet tegen de bacteriophaga Ty 5. Het spreekt vanzelf, dat dit niet in overeenstemming kan zijn met de theorie, die d'Hérelle hiervoor heeft gegeven. Wanneer de bacteriophaga Ty 5 sterker is dan de bacteriophaga Ty-Gä 7, dan kan de bacteriophaga Ty-Gä 7 niet sterker zijn dan de bacteriophaga Ty 5. Dezelfde proef werd herhaald met drie willekeurige andere Ty-stammen en dezelfde bacteriophagen. Al de gebruikte stammen waren drie maal van een aparte kolonie afgeënt. Het resultaat was hetzelfde als dat met den stam Ty 1460.

De volgende hypothese geeft een verklaring van boven-

staande waarneming. De beide bacteriophagen, Ty 5 en Ty-Gä 7, hebben verschillende, onafhankelijke, aangrijpingspunten in de bacterie, die zij resistent maken. Zoo maakt in de beschreven proef de bacteriophaga Ty 5 zijn eigen aangrijpingspunt resistent. Hierdoor wordt de bacteriestam echter niet resistent tegen de bacteriophaga Ty-Gä 7, die een ander, onafhankelijk, aangrijpingspunt heeft. Omgekeerd maakt de bacteriophaga Ty-Gä 7 zijn eigen aangrijpingspunt ontoegankelijk, maar niet dat van de bacteriophaga Ty 5.

Op dezelfde wijze als de phagen Ty 5 en Ty-Gä 7, werden verschillende andere bacteriophagen geïsoleerd, alle uit oppervlaktewateren in Nederland. Deze zijn zoover van elkaar verwijderd, dat men deze bacteriophagen alle als verschillende bacteriophagenstammen moet beschouwen.

Alle met Ty 1460 geïsoleerde bacteriophagen werkten uitsluitend op Typhusbacillen; zij werden $3 \times$ van aparte plagues afgeënt. De met Gärtnerstam 13 geïsoleerde bacteriophagen werkten soms ook op Typhusbacillen; deze bacteriophagen werden aangehouden. Zij doorliepen, evenals bacteriophaga Ty-Gä 7, twintig passages met den stam Gä 13, waarbij even-

TABEL I.

Affiniteit van de gebruikte bacteriophagen voor verschillende bacteriesoorten.

Bacteriophagen wier affiniteit voor deze stammen werd onderzocht	Plaats van isolatie	Onderzochte bacteriesoorten											
		Typhus Gärtner (4 stammen)	Sanguinarium	Stanley	Derby	Abortus equi	Reading	Paratyphus B (Schoftmüller)	Paratyphus A	Coli 80	Coli (4 andere stammen)	Prodigiousus	Cholera
Bacteriophaga													
" Ty 1	Utrecht, Oudegracht .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" Ty 2	Rotterdam	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" Ty 3	Tusschen R'dam-Delft	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" Ty 4	Delft	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" Ty 5	den Haag	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" Ty-Gä 6	den Haag	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—
" Ty-Gä 7	Leiden	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—
" Ty-Gä 9	Utrecht, Oudegracht .	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—
" Ty-Gä 10	Utrecht, Nieuwegracht	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—

+ beteekent dat de stam wordt aangetast door de aangegeven bacteriophaga.

— beteekent dat de stam resistent is tegen de aangegeven bacteriophaga.

eens 9 × van een aparte plage werd afgeënt. Het is dus aan te nemen, dat alle gebruikte phagen „rein” waren.

In de tabel I ziet men de affiniteit van de verschillende bacteriophagen, voor verschillende bacteriesoorten aangegeven en tevens de plaats van isolatie. Van stam Ty C werden secundaire cultures verkregen, met de negen in Tabel I aangegeven bacteriophagen. Deze werden op resistentie onderzocht tegen alle negen aangegeven bacteriophagen met de reeds aangegeven methode op een agarplaat, waarop gemakkelijk negen bacteriophagen naast elkaar op hun affiniteit voor een secundaire cultuur onderzocht konden worden. Het resultaat geeft tabel II.

TABEL II.

Resistentie van secundaire cultures van stam Typhus C verkregen na lysis met negen verschillende bacteriophagen, tegen deze negen bacteriophagen.

Bacteriophagen, waartegen de resistentie werd onderzocht		Secundaire cultures, verkregen met de negen verschillende bacteriophagen, als bij elk aangegeven.								
		Ty C, secundair van bacteriophag Ty 1	Ty C, secundair van bacteriophag Ty 2	Ty C, secundair van bacteriophag Ty 3	Ty C, secundair van bacteriophag Ty 4	Ty C, secundair van bacteriophag Ty 5	Ty C, secundair van bacteriophag Ty-Gä 6	Ty C, secundair van bacteriophag Ty-Gä 7	Ty C, secundair van bacteriophag Ty-Gä 9	Ty C, secundair van bacteriophag Ty-Gä 10
Bacteriophag	Ty 1	—	—	—	—	—	+	+	+	+
"	Ty 2	—	—	—	—	—	+	+	+	+
"	Ty 3	—	—	—	—	—	+	+	+	+
"	Ty 4	—	—	—	—	—	+	+	+	+
"	Ty 5	—	—	—	—	—	+	+	+	+
"	Ty-Gä 6	+	+	+	+	+	—	—	—	—
"	Ty-Gä 7	+	+	+	+	+	—	—	—	—
"	Ty-Gä 9	+	+	+	+	+	—	—	—	—
"	Ty-Gä 10	+	+	+	+	+	—	—	—	—

+ is lysis door de aangegeven bacteriophag.

— is resistent tegen de aangegeven bacteriophag.

In tabel I ziet men reeds, dat de hier besproken bacteriophagen zich in twee groepen laten indeelen. De eerste groep bevat de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5, die zonder uitzondering van alle onderzochte bacteriesoorten, uitsluitend Ty-bacillen aangrijpen. De andere groep bevat de bacteriophagen Ty-Gä

6-7-9-10, die ook eenige andere, gedeeltelijk dezelfde, bacteriesoorten aangrijpen.

In tabel II treft men dezelfde twee groepen weer aan. De reden hiervan zal later duidelijk worden. De bacteriophagen van de eerste groep, Ty 1-2-3-4-5, maken den stam Ty C resistent tegen elkaar, maar niet tegen de bacteriophagen van de tweede groep, n.l. de bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10. Omgekeerd maken de bacteriophagen van de tweede groep, Ty-Gä 6-7-9-10, de stam Ty C resistent tegen elkaar, maar niet tegen de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5. Het is gemakkelijk deze verhouding te verklaren met de opgestelde hypothese.

De bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5 bezitten alle hetzelfde aangrijpingspunt; een ander gemeenschappelijk, doch van het vorige onafhankelijk aangrijpingspunt bezitten de bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10. Zoo is het te verklaren, dat de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5 onderling de bacterie, zonder uitzondering, resistent maken; zij grijpen alle de bacterie in hetzelfde punt aan en maken dit resistent, niet alleen tegen zichzelf, maar tegen alle ook daar aangrijpende bacteriophagen. Evenzoo gaat het in de groep Ty-Gä 6-7-9-10.

In deze groepen zijn, zooals mij gebleken is, duidelijk virulentie-verschillen waar te nemen. Zoo is de bacteriophaga Ty 1 duidelijk veel virulenter dan Ty 3. Toch geeft Ty 3 resistentie tegen Ty 1. Kleine en middelmatig-groote virulentie-verschillen spelen dus geen rol bij de verkregen resistentie. Of zeer groote virulentie-verschillen een rol kunnen spelen blijft nog een open vraag.

Volgens Marcuse grijpt de bacteriophaga de bacterie aan in de receptor. De bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10 grijpen volgens deze theorie Ty-bacillen aan in de receptor, die zij met Gä-bacillen gemeen hebben, dus in de receptor III ¹⁾. Men ziet in de tabel I, dat zij alle bacteriën, die deze receptor bezitten, dus behalve Typhus, ook Gärtner en Sanguinarium, aantasten. Evenwel tasten zij ook andere bacteriën, die deze receptor niet bezitten, aan. Zij hebben dus affiniteit voor meer dan één receptor.

De bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5, die alleen Typhusbacillen lyseeren, moeten aangrijpen op een receptor, die tot Typhus-

¹⁾ III volgens het schema van Bruce White.

bacillen beperkt is. Het eenige thans bekende antigeen, dat aan die voorwaarde voldoet, is het Typhus Vi-antigeen. Deze Vi-receptor is niet of minder aanwezig, volgens Felix, in Ty-stammen die zich goed door Gä-serum laten agglutineeren. In mijn experimenten waren de stammen, die zich goed door Gä-serum lieten agglutineeren, veel minder of in het geheel niet gevoelig voor de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5. Dit geeft dus veel steun aan de opvatting, dat deze bacteriophagen Ty-bacillen in het Vi-antigeen aantasten. Het feit, dat juist die bacteriophagen, die althans gedeeltelijk dezelfde affiniteit voor verschillende bacteriesoorten hebben, onderling een bacterie resistent maken, vindt ook een verklaring. Zij grijpen in dezelfde receptor aan en maken daardoor de bacterie resistent tegen elkander. Aan den anderen kant zullen zij ook alle bacteriesoorten aangrijpen, die deze zelfde receptor bezitten; vandaar het parallelisme met de affiniteit voor diverse bacteriesoorten, zooals uitkomt bij vergelijking van tabel I en II.

Wat is nu de verklaring voor de verhouding, die d'Hérelle tot zijn theorie heeft doen komen? Deze verhouding is, dat, wanneer een bacteriophagaag een bacterie resistent maakt tegen zichzelf, maar niet tegen een tweede bacteriophagaag, deze tweede (zooals aangenomen wordt door d'Hérelle ook sterkere) bacteriophagaag een breedere immuniteit doet optreden, en resistent maakt tegen beide bacteriophagen. Dit kan met de theorie, die pas is ontworpen, ook verklaard worden. Men heeft gezien, dat de bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10 meer dan een receptor aantasten. Men kan zich gemakkelijk voorstellen, dat bacteriophagen, die meerdere receptoren aantasten, ook voor de Vi-receptor affiniteit hebben. Deze phagen maken den stam resistent tegen zichzelf, en tegen bacteriophagen als bacteriophagaag Ty 1. Maar bacteriophagaag Ty 1 zal dezelfde bacterie niet resistent maken tegen een bacteriophagaag, die behalve de Vi-receptor nog een andere receptor aantast. Het feit, dat de gebruikte bacteriophagen bijna uitsluitend passages maakten met Gä-bacillen, veroorzaakte misschien dat bacteriophagen werden verkregen zonder affiniteit voor de Vi-receptor.

Conclusies.

1. Het feit, dat de met een bepaalde bacteriophagaag verkregen resistentie niet tegen alle bacteriophagen beschut, moet

verklaard worden, doordat verschillende bacteriophagen verschillende aangrijpingspunten in de bacterie bezitten. Deze zijn waarschijnlijk de receptoren.

2. Typhusbacillen, die goed door Gärtner-serum worden geagglutineerd, worden door bacteriophagen, die zoowel op Typhus als op Gärtnerstammen werken, speciaal goed gelyseerd.
3. Bij toepassen van de theorie van Marcuse, volgens welke de bacteriophaga de bacterie in de receptor aantast, zullen de sub 2 genoemde bacteriophagen deze bacteriën in de receptor III (schema Bruce White) aantasten.
4. Typhusbacillen, die zich zeer goed door Gärtner-serum laten agglutineeren, worden door Typhus-specifieke bacteriophagen slecht aangetast.
5. Er zijn redenen aan te nemen, dat Typhus-specifieke bacteriophagen Typhusbacillen in hun Vi-antigeen aantasten.

Samenvatting.

Het feit, dat de verkregen resistentie tegen een bacteriophaga niet altijd tegen lysis door andere bacteriophagen beschut, wordt door d'Hérelle verklaard door virulentie-verschillen.

De volgende proef kan zoo niet verklaard worden:

Van twee bacteriophagen, n.l. Ty 1, die alleen Typhusbacillen aantast, en Ty-Gä 7, die o.a. ook affiniteit voor Gä-bacteriën heeft, maakt de bacteriophaga Ty 1 typhusstammen resistent tegen zichzelf, maar niet tegen Ty-Gä 7. De bacteriophaga Ty-Gä 7 maakt omgekeerd de bacterie resistent tegen zichzelf, maar niet tegen Ty 1. Dit wordt verklaard, doordat de twee bacteriophagen ieder een verschillend aangrijpingspunt in de bacterie hebben.

Andere bacteriophagen werden geïsoleerd, vier die alleen op Ty-bacillen werken, en drie die o.a. ook Gä-bacillen aantasten. Elk der vijf bacteriophagen, die alleen Typhusbacillen aantasten (bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5) maakt typhusbacillen resistent tegen elk van deze vijf bacteriophagen, maar niet tegen de vier bacteriophagen, die ook Gä-bacillen aantasten. Omgekeerd maakt elk der vier bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10,

typhusbacillen resistent tegen elk van deze vier bacteriophagen, maar tegen geen der bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5.

Dit wordt verklaard, door aan te nemen dat de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5 alle hetzelfde aangrijpingspunt in de bacterie hebben, hetwelk een ander is dan het gemeenschappelijke aangrijpingspunt van de bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10.

Redenen worden aangevoerd, waarom het waarschijnlijk is dat het aangrijpingspunt van de bacteriophagen Ty 1-2-3-4-5 de Typhus Vi-receptor is, dat van de bacteriophagen Ty-Gä 6-7-9-10 de receptor III (Schema Bruce-White).

Boekaankondigingen.

Dr. A. Vedder, Leerboek der Bacteriologie en Immunologie; met 10 portretten, 162 afbeeldingen tusschen de tekst, benevens 6 platen in kleuren; Haarlem, De Erven F. Bohn N.V., 1935.

Sedert het Leerboek der klinische Bacteriologie van Van Calcar, was er geen Nederlandsch werk over de bacteriologie en immuniteitsleer verschenen. Merkwaardig feit, dat thans in een korte spanne tijds twee dergelijke boeken het licht hebben gezien. Men zou zich echter vergissen, indien men daaruit zou afleiden, dat thans een embarras du choix in het spel zou zijn, want, hoewel beide boeken, dat van Dr. H. W. Julius, Beginselen der Algemeene Bacteriologie en Immuniteitsleer, en dat van Vedder hetzelfde onderwerp behandelen, is de opzet er van en zijn opvattingen der schrijvers zó uiteenlopend, dat wij ons gelukkig rekenen, dat beide werken onze vaderlandsche litteratuur hebben verrijkt.

Het boek van Julius is algemeen gehouden, draagt een zeer uitgesproken persoonlijk cachet, het werk van Vedder is volgens het oude recept geschreven, zal, uit dat oogpunt beschouwd, bovenal voor de bacterioloog-practicus waarde hebben. Indien men dan ook geroepen is de bacteriologie en immunologie te doceren, dan zal men zeker niet kunnen nalaten beide werken zijn leerlingen aan te bevelen.

Ik aarzel geen oogenblik Vedder's leerboek als zoodanig te prijzen. Het doet mij prettig aan, dat Vedder een ruim gebruik gemaakt heeft van de Nederlandse litteratuur, waardoor het tevens een goede blik doet slaan op het vele werk, dat onze vaderlandse bacteriologen en serologen hebben gepresteerd, ook al is hij daarbij niet volledig geweest; maar welke menschenlijke arbeid is volledig? Zo mis ik node het vermelden van de onderzoekingen van Dr. H. H. de Wolff

over de biochemische eigenschappen der Diphtherie- en Pseudodiphtheriebacteriën.

In dit verband beschouwd, is het ook niet meer dan natuurlijk, dat het boek niet volmaakt is, dat er grotere en kleinere omissies en onjuistheden kunnen worden aangewezen, ook, dat het wel eens te veel wil geven, waardoor het niet steeds aan duidelijkheid wint.

Er ontbreekt een goede beschrijving van de diphtheriekolonie op de telluurplaat. Waarom laat de schrijver het onderzoek van de Löfflerplaat eerst na 24 uur, zelfs na 48 uur verrichten, waar toch een onderzoek na 8 tot 18 uur de beste kansen biedt een verwisseling met pseudodiphtherie te voorkomen? Waarom wordt nog steeds zo angstvallig van paardenserum gebruik gemaakt, waar blijkt, dat even goed het bloedserum van andere dieren tot even juiste resultaten voert?

Bij het onderzoek der meningococcen worden nòch de complementbindingsreactie, nòch de handige praecipitinereactie op het lumbaalvocht vermeld. Ook het microscopisch beeld van het gekleurde praeparaat van het cerebrosпинаalvocht geeft bij juiste waarneming en interpretatie waardevolle aanwijzingen, waarop wel wat meer de aandacht had kunnen worden gevestigd. Is fixatie in deze en dergelijke gevallen met behulp van methylalcohol niet beter, waardoor het cellig materiaal fraaier en duidelijker kan worden waargenomen?

Bij psittacosis had dienen te worden vermeld, dat deze ziekte bij papagaaïen en parkieten soms endemisch voorkomt, waarvan gevallen in de litteratuur vermeld zijn, terwijl de ziekte bovendien wel degelijk van mensch op mensch kan overgaan.

Waar Vedder betoogt, dat haemolysinen specifiek zijn, daar had hij moeten spreken van relatief, omdat de amboceptoren, bereid met schapenbloedlichaampjes, zij het dan ook tot een zeer laag titer, soms toch mede een werkzaamheid ontvouwen ten opzichte van erythrocyten van andere afkomst, bijv. van het rund. Zijn niet de meeste immunoreacties relatief specifiek, d.w.z. tevens ten nauwste gebonden aan quantitative verhoudingen?

Dat antitoxische sera nooit als zoodanig worden gebruikt, maar steeds gezuiverd, is onjuist, diphtherie- en tetanusserum worden minstens even veel malen ongezuiverd toegediend.

Indien het boek een herdruk mag beleven, zouden wij het alphabetisch register gaarne vollediger wensen te zien, omdat lang niet alle onderwerpen daarin te vinden zijn, hetgeen voor het raadplegen zo prettig en gemakkelijk is. En indien dan tevens verbeteringen mochten worden aangebracht, zou ik den schrijver adviseren de afkortingen voor c.c., M., L. enz. in overeenstemming te brengen met de internationaal daarvoor aangenomen teekens, nml. cm³, m, 1, enz.

Echter deze opmerkingen mogen volstaan, zij wijzigen mijn oordeel niet, dat wij een degelijk en bruikbaar vaderland's boek rijker werden.

De typographische verzorging is uitstekend, de platen in het algemeen zeer fraai.

Prof. Dr. Alb. J. J. van de Velde, Het Rijk der Microben; N.V. Het Kompas, Mechelen en N.V. de Spieghel te Amsterdam, 1934.

Van een geheel ander karakter is het boek van Van de Velde, dat als deel van de Wetenschappelijke Bibliotheek, rubriek Biologie, onder leiding van Prof. Dr. L. Elaut, is verschenen.

Men spreekt wel eens van wetenschappelijke belletrie, welnu, daaronder zou ik het boek van Van de Velde willen rangschikken, dat in betrekkelijk klein formaat en voor weinig geld (Fr. 20 ingenaaid, Fr. 28 gebonden) den lezer op aangename en onderhoudende wijze het een en ander over de microben mededeelt. Bovendien verluchtigen een aantal goede portretten van bekende bacteriologen het geheel, waaronder wij met voldoening die van Beyerinck en Eijkman aantreffen.

Het boek getuigt van de belezenheid van den auteur, die zich op een ruim en algemeen standpunt heeft gesteld en in kort bestek het heeft weten klaar te spelen de belangrijkste feiten uit de algemene microbiologie de lezer te verduidelijken.

Om een denkbeeld te geven van de wijze, waarop de schrijver zijn stof heeft verhandeld, is een overzicht van de verkorte inhoud zeker het meest geëigend. In het eerste hoofdstuk wordt de ontdekking van Van Leeuwenhoek vermeld, waarbij, zoals zo menigmaal, Anthony wordt ge-

schreven, terwijl het feitelijk Antoni moet zijn, ook ons tijdschrift is te dien opzichte niet geheel juist! Tevens wordt getracht de omvang der microbenleer te omgrenzen, waaruit blijkt, dat de schrijver zich daarbij op ruim standpunt stelt. Hierop wordt in een volgende „paal”, zoals het „hoofdstuk” wordt geheten, een kort overzicht van het historisch gebeuren geschetst, waar de strijd over de generatio spontanea als van zelf voert tot de moderne bacteriologie, zodat als aanvang der microbenleer het jaar 1861 wordt vermeld. Het volgend hoofdstuk behandelt de historische ontwikkeling van oudheid tot heden, alles natuurlijk in hoogst beknopte vorm. Een afzonderlijk hoofdstuk is gewijd aan hen, die een Nobelprijs kregen, waarbij de auteur zich beperkt tot de microbiologen. Gelukkige gedachte, om ook aan hen, die geen dergelijke onderscheiding deelachtig werden, tevens aandacht te schenken.

Het wordt vervolgens nodig geoordeeld een indruk te vestigen van de bacteriologische methodiek, waarbij langere tijd wordt stil gestaan bij het microscoop en zijn uitrusting, terwijl daarenboven de inrichting van het microbiologisch laboratorium niet vergeten wordt. Hier treft men mede aan voorschriften van voedingsbodems voor bacteriën, gisten, protozoën en wieren. De systematiek wordt evenmin vergeten, waarbij de schrijver zich aan de rangschikking der Amerikaanse bacteriologen houdt, ook het virus en de bacteriophagaag worden daarbij vermeld.

In afzonderlijke hoofdstukken worden de gisten, de schimmels en de protozoën en de fermenten, vitaminen en hormonen behandeld, waarna de aandacht wordt gebracht op de bacteriën, de stofwisseling en rol der bacteriën in de natuur, verschillende microbiologische processen worden daarbij kort vermeld, waarbij zich aansluiten de bacteriën van bodem, lucht, water en van de melk, om ten slotte eenige der belangrijkste, pathogene klemen van mens, dier en plant te laten volgen. In de „Strijd tegen de besmetting” ziet de schrijver kans ook de immuniteitsproblemen aan te geven, met vaccino- en serumtherapie inbegrepen, waarbij zelfs de reactie van von Wassermann ter sprake wordt gebracht en even toegelicht.

Aan het slot worden enige proeven als didactische oefeningen vermeld.

Waar dit alles in een zéér beknopt bestek de lezer wordt

geboden, kan men zich van inhoud en strekking van dit zeker gecomprimeerde en uit de aard zeer oppervlakkige boekje een oordeel vormen. Wij wensden het een grote kring van belangstellenden gaarne toe, maar of de deskundige lezer er door voldaan wordt, vrees ik te moeten betwijfelen, daarvoor is het te schematisch en te dikwijls een enumeration rapide, welke beter gemist had kunnen worden.

W. C. DE GRAAFF.

Verslag van de Vergadering, tevens herdenkings-
bijeenkomst van het 25-jarig bestaan, der
Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie,
gehouden Zaterdag 23 Mei 1936, in het Gemeente Ziekenhuis,
Zuidwal 83, te 's-Gravenhage.

Onder ruime belangstelling — op de presentielijsten zijn in het geheel de namen vermeld van 54 leden en 12 gasten — wordt stipt 10 uur de vergadering, waarvan de middag zal zijn gewijd aan de herdenking van het 25-jarig bestaan der Vereeniging, door den voorzitter, Prof. *Flu*, geopend.

In zijn openingswoord wijst deze op het bizonder karakter van de bijeenkomst. Waar alleen de morgenuren voor het houden van voordrachten beschikbaar zijn, is korthed der besprekingen geboden, waarom hij er ook bij de sprekers op aan-dringt deze wel zooveel mogelijk te betrachten.

Ingekomen Stukken.

Bericht van verhindering tot het bijwonen van de vergade-ring en het noenmaal is ingekomen van Prof. *Sleeswijk*, Prof. *De Graaff* en Dr. *Van Roojen*, geneesheer-directeur van het Gemeente Ziekenhuis, die onderscheidenlijk als medeoprichter der Vereeniging, als redacteur van het tijdschrift en als gast-heer hiertoe zijn uitgenoodigd, en van Jkvr. *Van Riemsdijk*, die van de oprichting der Vereeniging af lid is.

Verder zijn ingekomen:

1. Van Prof. *Westerdijk* de mededeeling, dat op dezen dag ook een vergadering plaats heeft van de Botanische Vereeniging.

Hierop is geantwoord, dat, om een dergelijk samenvallen te voorkomen, sedert eenige jaren met een 5-tal andere ver-eenigingen overleg plaats vindt bij het uitschrijven van ver-gaderingen, welke regeling goed werkt; in het vervolg zal ook

bedoelde Vereeniging, wanneer deze hierop prijs stelt, in dit overleg worden opgenomen.

2. Van de redactie van het te Canton in de Engelsche taal verschijnend „Lingnan Science Journal” het verzoek, om „Antonie van Leeuwenhoek” als ruilexemplaar te mogen ontvangen.

Aan dit verzoek — dat aantoont, hoe men ook in het verre China in staat is van den inhoud van dit in het Nederlandsch geschreven orgaan kennis te nemen — is voldaan; bedoeld tijdschrift zal worden gezonden aan het lid der redactie Dr. *Timmerman*, waarbij het in het Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid wordt bewaard.

3. Van het Nederlandsch Instituut voor Documentatie en Registratuur te 's-Gravenhage de uitnoodiging om gegevens der Vereeniging te verstrekken, teneinde die op te nemen in een gids, waarin vereenigingen, instellingen enz. zijn vermeld, die in staat zijn bibliografische inlichtingen of voorlichting te verschaffen van wetenschappelijken aard.

Aan deze uitnoodiging is gevolg gegeven door toezending van de Statuten der Vereeniging.

4. Verder zijn ontvangen van het Nederlandsch-Indisch Kanker Instituut te Bandoeng de voordrachten over gezwellen, gehouden op den Bosschadag 1935, het jaarverslag over 1934 en den klapper op de tumoren literatuur van Nederlandsch Oost-Indië.

Verslag van den secretaris.

De secretaris, Dr. *Van Nederveen*, deelt mede, dat de toestand der Vereeniging gunstig is; er zijn thans 118 gewone leden, zijnde 3 minder dan begin 1935 en een gelijk aantal — 4 — temporaire. ¹⁾ Alle vereenigingszaken verlopen geregeld en in rustige banen, ook wat het tijdschrift betreft; klachten hierover zijn niet vernomen. In het afgelopen jaar zijn de twee gebruikelijke vergaderingen gehouden, welke beide goed waren bezocht.

¹⁾ Tijdens de vergadering meldden zich 4 personen aan voor het gewone en één voor het temporaire lidmaatschap.

Verslag van de penningmeesteres en begrooting.

De penningmeesteres, Dr. *Broek*, geeft het volgende

Overzicht der Inkomsten en Uitgaven over 1935:

Inkomsten.		Uitgaven.	
Saldo 1 Januari 1935 . . .	f 2.288.27	Tijdschrift 1934.	f 892.50
Aan contributie	„ 1.210.—	Prof. De Jong-Stichting. . .	„ 50.—
Aan rente over 1935 . . .	„ 65.02	Biologische Raad	„ 25.—
		Onkosten secretaris	„ 28.46
		Idem penningmeesteres „	9.59
		Vergaderingen	„ 102.15
		Onvoorziene uitgave	„ 10.—
		Saldo 1 Januari 1936. . . .	„ 2.445.59
	<u>f 3.563.29</u>		<u>f 3.563.29</u>

Balans per 31 December 1935.

Bezittingen.		Schulden.	
Saldo spaarbank	f 2.279.04	Tijdschrift 1935	f 922.50
Saldo postrekening	„ 149.07	Saldo bezit	„ 1.523.09
Kas	„ 17.48		
	<u>f 2.445.59</u>		<u>f 2.445.59</u>

Saldo bezit op 31 December 1935 . . . f 1.523.09

„ „ „ „ „ 1934 . . „ 1.388.27

Winst over 1935 f 134.82

Van de kascommissie, bestaande uit de Heeren *Julius* en *Pondman*, is bericht ingekomen, dat zij de boekhouding over 1935 heeft nagezien en in orde bevonden, waarom zij voorstelt aan Dr. *Broek* kwijting te verleen en voor het door haar gevoerde beheer.

Dit geschiedt, op voorstel van den voorzitter, onder dankzegging.

Begrooting over 1936.

Deze luidt als volgt:

Inkomsten.		Uitgaven.	
Contributie	f 1.072.—	Tijdschrift	f 885.—
Rente	„ 65.—	Prof. De Jong-Stichting	„ 50.—
		Biologische Raad	„ 25.—
		Onkosten secretaris	„ 50.—
		Idem penningmeesteres	„ 15.—
		2 vergaderingen	„ 100.—
		Onvoorzien	„ 12.—
	<u>f 1.137.—</u>		<u>f 1.137.—</u>

De begrooting geeft geen aanleiding tot bespreking.

Aanwijzing dag en plaats najaarsvergadering.

Besloten wordt, op voorstel van het bestuur, de najaarsvergadering te houden op Zaterdag 14 November a.s. te Utrecht en hiervoor bij Prof. *Wolff* gastvrijheid te vragen.

Rondvraag.

Dr. *Ruys* vraagt, hoe het komt, dat van de zijde van het bestuur niets is vernomen over het a.s. congres der Internationale Vereeniging voor Microbiologie.

De *secretaris* deelt mede, dat de aanraking met deze Internationale Vereeniging vrijwel nihil is geweest. Van de oprichting hiervan kreeg het bestuur alleen zijdelings kennis uit een tijdschriftbericht, waarna, ingevolge een in een ledenvergadering genomen besluit, onze Vereeniging zich bij den algemeenen secretaris, Prof. *Kraus* te Weenen, voor het lidmaatschap heeft aangemeld. Hierop is een gedrukt papiertje ontvangen met de namen der in de verschillende landen bestaande comite's en de mededeeling in een noot, dat het eerste congres in October 1929 te Parijs zou plaatsvinden; na dien tijd is bij het bestuur nooit meer eenig teeken van leven van deze internationale vereeniging ingekomen.

Dr. *Timmerman* zegt, dat Prof. *Aldershoff*, tot nog toe de eigenlijke vertegenwoordiger voor Nederland, zich sedert kort heeft teruggetrokken en aan hem heeft verzocht als zoodanig te willen optreden. Spreker heeft hierin voorloopig toegestemd

en is bereid de zaken zoo lang loopende te houden, 'tot een betere oplossing zal zijn verkregen. Hij acht het n.l. gewenscht, dat onze Vereeniging het vertegenwoordigend lichaam voor Nederland zou worden.

De *voorzitter* vindt dit ook de beste weg.

Prof. *Kluyver* meent, dat men elk persoonlijk lid is en weet niet, of ook het lidmaatschap van een vereeniging mogelijk is.

Prof. *Klein* merkt op, dat de Italiaansche microbiologen als zoodanig een onderdeel van het congres vormen.

De *voorzitter* zegt, dat, naar aanleiding van deze bespreking, het bestuur zal onderzoeken, of onze Vereeniging als zoodanig lid kan zijn; in een volgende vergadering zal dan hierop worden teruggekomen.

Wetenschappelijk gedeelte.

Dr. A. *Tasman* doet een mededeeling over: „Stofwisselingsproeven met diphtheriebacteriën”, welke voordracht in haar geheel in dit Tijdschrift wordt opgenomen.

Op een na afloop gestelde vraag van Dr. *Van der Walle* antwoordt *spreker*, dat er een belangrijk verschil bestaat, welke peptonen worden gebruikt; met pepton-Witte verlopen de curven heel anders.

Ir. G. W. *Harmsen* spreekt daarna over: „Bacteriologische moeilijkheden bij het kweken van groote hoeveelheden wortelknolletjes organismen”.

Ten behoeve van het enten van de in den Wieringermeerpolder gezaaide klavers en andere leguminosen moesten in den loop van de laatste jaren zeer groote hoeveelheden wortelknolletjes organismen gekweekt worden, tot 700 Kg. bacteriemassa per jaar toe.

Deze taak bleek, bij de niet fabriekmatige inrichting van het laboratorium, niet eenvoudig te zijn en moesten verscheidene moeilijkheden worden overwonnen. Een van de voornaamste hinderpalen vormden de talrijke besmettingen uit de lucht, die, tengevolge van de groote hoeveelheden geschikte voedingsstoffen, tijdens de kweekcampagne epidemisch optraden en tenslotte het geheele laboratorium zoodanig in bezit namen, dat de normale steriliteitsmaatregelen niet meer toereikend werden en een bijzondere werkwijze gevolgd moest worden, om de cultures zuiver te houden.

De meest gevaarlijke en hinderlijke organismen waren enkele vertegenwoordigers der aërobe groep sporevormers en een tot het geslacht *Monilia* behorende zalmkleurige schimmel.

Naast de bestrijding dezer infecties moest ook de noodige aandacht besteed worden aan het uitwerken van die voedingsbodems, waarop de grootste opbrengsten der cultures verkregen konden worden. Het was hierbij niet voldoende, om *veel* te oogsten, de verkregen cultuur moest ook de meest geschikte hoedanigheid hebben.

Ten slotte moest ook met behulp van cultuur contrôleproeven op het veld de saamhoorigheid van de verschillende cultures met de vlinderbloemige gewassen nagegaan worden, om voor elk gewas de meest werkzame cultuur te kunnen kweken.

Gedachtenwisseling.

Dr. *Den Dooren de Jong* merkt op, dat de moeilijkheden met de sporevormers kunnen worden veroorzaakt door het krijt.

Spreker acht dit volkomen juist.

Prof. *Westerdijk* vraagt, of de petriscalen naakt op de tafel worden gezet en geeft dan in overweging deze altijd in papier in te pakken, hetgeen de besmetting van buiten buitengewoon beperkt. Verder vraagt zij, of het laboratorium van hout is opgetrokken.

Spreker antwoordt, dat verpakking in papier door het hierdoor veroorzaakte meerdere werk niet is toe te passen. Het laboratorium is van hout en de ontsmetting heeft plaats met creoline.

Prof. *Westerdijk* raadt aan, hiervoor formaline te gebruiken.

Dr. *Tasman* geeft in overweging Rouxflesschen te gebruiken in plaats van petriscalen en Prof. *Kapsenberg*, om met vierkante jeneverflesschen te werken, zooals men in Indië doet.

Spreker merkt op, dat hierbij de cultuur zoo lastig is te verzamelen.

Prof. *Kluyver* bevestigt, dat het zoo buitengewoon moeilijk is, om krijtplaten te steriliseeren; met het krijt kan men gemakkelijk infecties medebrengen.

Prof. *Flu* raadt aan, om de cultuur niet op de gewone wijze te oogsten, maar door het afschudden met glasparels, indien dit mogelijk is.

Dr. Ir. K. T. *Wieringa* behandelt vervolgens: „Het voort-

gezette onderzoek van wijlen Prof. Dr. N. L. Söhngen over het verdwijnen van koolzuur en waterstof onder anaerobe voorwaarden”.

De waarneming 30 jaar geleden door *Söhngen* gedaan, dat koolzuur en waterstof onder anaerobe voorwaarden door bacteriën in methaan worden overgevoerd, was het logische gevolg van het feit, dat in de methaan gistingen der vetzure zouten kan worden geabsorbeerd.

Korten tijd voor zijn dood werd dit onderzoek door *Söhngen* opnieuw opgevat. Met behulp van verbeterde toestellen en van betere groeivoorwaarden voor de microben kon de snelheid van het proces zeer belangrijk worden opgevoerd. Terwijl bij de vroegere proefnemingen ongeveer 1200 cc waterstof in 14 dagen werden omgezet, was nu een omzetting van 1.5 L. per etmaal geen zeldzaamheid.

Het bleek, dat in ruwculturen aanvankelijk belangrijke hoeveelheden van de geabsorbeerde waterstof niet als methaan, maar als azijnzuur in de gevormde producten verschijnen. Door vroege overenting, zoowel als door pasteurisatie, gelukte het de azijnzuurvorming van de methaanvorming te scheiden. Van de zuurvormende sporevormers werd de reincultuur verkregen. Deze bacteriën zetten waterstof en koolzuur in de verhouding 2 : 1 vrijwel quantitatief in azijnzuur om; slechts sporen mierenzuur konden daarnaast worden aangetoond.

De bacterie der anaerobe azijnzuurvorming is een beweeglijke staaf met eindstandige spore.

Het is thans een open vraag of er inderdaad bacteriën bestaan, die waterstof en koolzuur direct tot methaan kunnen omzetten.

Gedachtenwisseling.

Op een vraag van Dr. *Tasman* antwoordt *spreker*, dat alleen maar sporen mierenzuur zijn gevonden.

Prof. *Kluyver* vraagt, of hij goed heeft begrepen, dat de sporevormende bacterie alleen de azijnzuurproducent is en deze onder geen voorwaarde methaan vormt.

Spreker antwoordt bevestigend.

De laatste spreker, Dr. *F. C. Gerretsen*, houdt daarna een voordracht, getiteld: „Iets over den invloed van sporen man-

gaan op het weerstandsvermogen van de haverplant tegenover het aantasten door bacteriën”.

Door mangaangebrek kunnen in de haverplant bepaalde ziekteverschijnselen optreden, bekend onder den naam „Veenkoloniale Haverziekte” (Dörrfleckenkrankheit; Grey-speck disease). Het is echter gebleken, dat, wanneer men het wortelstelsel van de planten steriel houdt, de planten met even weinig mangaan als de zieke, toch gezond kunnen blijven, alhoewel zij kleiner zijn dan de gezonde planten.

De wortels van mangaanarme planten zijn vaak aangetast; op en in de worteltoppen van deze planten vindt men dan ook 4 tot 5 maal zooveel bacteriën als in die van mangaanrijke planten. Omgekeerd kan men op gesteriliseerden mangaanarmen grond de haverziekte weer te voorschijn roepen door besmetting met enkele procenten zieken grond. Steriele, mangaanarme watercultures worden door besmetting met een enkel ziek worteltopje of met een mengsel van verschillende bacteriën, uit zieke wortels afgezonderd, eveneens ziek.

De ammoniakale splitsingsproducten, ontstaan door het aantasten van het wortelstelsel door bacteriën, worden met den sapstroom omhoog gevoerd en geven in de bladeren aanleiding tot het ontstaan van typische bladvlekken.

Door mangaangebrek blijkt het weerstandsvermogen van het wortelstelsel tegenover saprophytische microben sterk af te nemen, zoodat ook deze zich als parasieten gaan gedragen.

Bepalingen van den oxydatie-reductiepotentiaal in bladmoes-suspensie met en zonder toevoeging van mangaan, in het donker en bij verlichting, maken het waarschijnlijk, dat mangaan een integreerende rol vervult bij de fotosynthese. Mangaanarme bladeren assimileeren per 100 cm² en per uur minder dan de helft CO₂, vergeleken met normale bladeren. Doordat het wortelstelsel minder assimilaten toegevoerd krijgt, blijft het klein, de celdeeling is vertraagd en bij anatomisch onderzoek blijkt, dat de celwanden dunner zijn dan bij normale wortels; hierdoor wordt het verminderde weerstandsvermogen tegenover het aantasten door bacteriën bij mangaanarmoede tot zekere hoogte verklaard.

Gedachtenwisseling.

Prof. Wolff wijst op het belang van deze voordracht, niet

alleen uit het oogpunt van plantenpathologie, maar ook voor den medischen toevoeder, omdat mangaan ook invloed heeft op de ontwikkeling van hogere dieren en den mensch; ook voor de voeding is het van belang, dat mangaan en dergelijke mineralen in de planten aanwezig zijn.

Prof. *Kluyver* vraagt nog enkele inlichtingen, o.a. over de technische uitvoering der proeven.

Te ruim één uur is de morgenvergadering geëindigd, waarna de deelnemers per hiervoor gereedstaande autobussen zich begeben naar den huize *Anjema* aan den Langen Vijverberg tot het gebruiken van een, iets meer feestelijk dan gewoon, noenmaal.

De *voorzitter* heet hier met een kort woord de aanwezigen — juist 50 in getal — welkom, meer in het bijzonder de gasten.

Namens deze wordt door den oud-voorzitter, Prof. *Schüffner*, aan het bestuur dank gezegd voor de tot hen gerichte uitnoodiging, waarna te ongeveer 3 uur de maaltijd, die weer is gekenmerkt door een zeer gezelligen geest, is beëindigd en de aanzittenden per auto naar den Zuidwal worden teruggebracht.

In de nu volgende middagbijeenkomst vindt de eigenlijke herdenking plaats van het 25-jarig bestaan der Vereeniging. Het woord wordt hierbij achtereenvolgens gevoerd door:

Prof. *A. Klein*: „Over de oprichting der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie” en

Prof. Dr. *P. C. Flu*: „Over de verdere lotgevallen der Vereeniging”, waarna

Prof. Dr. *A. J. Kluyver*, als uitgenoodigd spreker, een rede houdt over: „De wereld der microben: verleden, heden en toekomst”.

Deze voordracht, toegelicht met tal van lichtbeelden, welke met de beide vorige redvoeringen in haar geheel in dit Tijdschrift wordt geplaatst, mag als een waardig slot worden beschouwd van deze geslaagde herdenkingsvergadering, die tot het einde toe met veel belangstelling is gevolgd.

De secretaris,
H. J. VAN NEDERVEEN.

's-Gravenhage, Mei 1936.

Over de oprichting der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie ¹⁾

DOOR

Prof. A. KLEIN.

Mijnheer de Voorzitter, Dames en Heeren!

De vereerende uitnoodiging door het Bestuur onze Vereeniging tot mij gericht, om ter gelegenheid van het 25-jarig bestaan der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie een en ander uit de geschiedenis van de oprichting onze Vereeniging mede te deelen, heb ik volgaarne aanvaard. Volgaarne, omdat ik een kwart eeuw geleden zeer actief heb deelgenomen aan de stichting onze Vereeniging. Het is derhalve begrijpelijk, dat de ontwikkeling en bloei onze Vereeniging na een levensduur van 25 jaren mij ten eerste te harte gaan.

Door mij en vele anderen, werkzaam op microbiologisch terrein, werd indertijd zeer sterk het gemis gevoeld aan een landelijke vereeniging van microbiologen, zooals dergelijke vereenigingen in verschillende landen reeds sedert geruimen tijd bestonden, o.a. in Amerika de „Society of American Bacteriologists”, in Duitschland „die Freie Vereinigung für Mikrobiologie”, enz. Ook in ons land werd in dien tijd veel gearbeid op het gebied der microbiologie van den landbouw, op het gebied der technische microbiologie, der veterinaire en geneeskundige microbiologie. Maar eenigerlei band tusschen deze verschillende op zoo na-verwante gebieden werkzame onderzoekers ontbrak ten eenenmale. En dit was inderdaad zeer te betreuren. In een vereeniging toch, waarin de microbiologen van verschillende schakeering tezamen kwamen, zoude de gelegenheid bestaan

¹⁾ Voordracht gehouden ter gelegenheid van de herdenking van het 25-jarig bestaan der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie op Zaterdag 23 Mei 1936.

kennis te nemen van de wederzijdsche onderzoekingen, zeer zeker niet zelden van groote beteekenis voor de werkzaamheden op eigen gebied; gedachtenwisselingen zouden kunnen plaats vinden, inlichtingen gevraagd worden over onderwerpen, waarmede men op zijn speciaal terrein niet dagelijks in aanraking kwam; algemeene vraagstukken, bezien van de onderscheidene standpunten, door de onderzoekers ingenomen, zouden aan de orde gesteld kunnen worden; enz. De drang tot de stichting van een dergelijke vereeniging werd ten slotte zoo sterk, dat een door Sleeswijk opgestelde circulaire aan de verschillende microbiologen in den lande werd toegezonden, in welke circulaire de beteekenis van een Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie uitvoerig werd uiteengezet. Het lag dan in de bedoeling, om bij genoegzame sympathiebetuigingen, ter gelegenheid van het in dat jaar, 1911, te Groningen te houden Natuur- en Geneeskundig Congres, de Vereeniging op te richten. Er kwamen zoovele gunstige, voor het meerendeel zelfs enthousiaste instemmingen met het plan binnen, dat op Donderdag 20 April 1911 in mijn laboratorium te Groningen de stichtingsvergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie gehouden kon worden. De eigenlijke herdenkingsdag van de geboorte onzer Vereeniging is derhalve 20 April. De oprichting van onze Vereeniging voor Microbiologie kan mede een van de belangrijke resultaten genoemd worden, welke het Natuur- en Geneeskundig Congres te Groningen in het jaar 1911 heeft opgeleverd. Een voorloopig bestuur, bestaande uit Beijerinck, Poels, Broers, Sleeswijk en mijn persoon, werd ingesteld, welk voorloopig bestuur op de eerste wetenschappelijke bijeenkomst der Vereeniging, die op 11 November van datzelfde jaar te Delft werd gehouden, tot het definitief bestuur voor het jaar 1912 werd verkozen. Beijerinck werd voorzitter, de eerste voorzitter van onze Vereeniging.

Wij waren er onmiddellijk op bedacht onze Vereeniging in het buitenland bekend te maken en haar tevens eenigen uitwendigen luister bij te zetten. Een aantal buitenlandsche corypheeën op verschillende microbiologische gebieden — Metchnikoff te Parijs, Winogradsky te Leningrad, Gaffky en Ostertag te Berlijn, Wright te Londen, Ehrlich te Frankfort, Bordet te Brussel en Jensen te Kopenhagen — stelden het, blijkens hun antwoorden, op hoogen prijs tot corresponderend

lid van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie benoemd te zijn.

Onze jonge Vereeniging had van het eerste oogenblik af van haar bestaan niet over haar succes te klagen. Onmiddellijk traden 45 leden toe, welk aantal het volgende jaar reeds tot 65 steeg en daarna nog zoodanig toenam, dat reeds in betrekkelijk korten tijd het 100-tal was overschreden. Op deze getallen moge op den huidigen feestdag wel de bijzondere aandacht gevestigd worden, indien men in aanmerking neemt, dat o.a. de groote Amerikaansche Vereeniging, de „Society of American Bacteriologists”, die reeds 36 jaren bestaat en, naast eenige buitenlandsche leden, de microbiologen van bijna geheel Noord-Amerika (Vereenigde Staten, Canada) omvat, blijkens de laatste in mijn bezit zijnde ledenlijsten van 1934 en 1935 ongeveer 900 namen telt. Het aantal leden onzer Vereeniging, bij en onmiddellijk na de oprichting ingeschreven, bewijst wel, dat de deelname voor een klein land als het onze bijzonder groot genoemd mag worden; een duidelijker kenmerk voor den bloei onzer Vereeniging, ook in haar jeugdperiode, kan wel niet geëischt worden.

Ik zoude inderdaad aan de historie te kort doen, indien ik het verlangen, om de verschillende microbiologen in den lande, ter wederzijdsche voorlichting, tot samenwerking bijeen te roepen, als het eenige motief aanwees, dat tot de oprichting van onze Vereeniging aanleiding heeft gegeven. Er bestond daarvoor nog een andere reden, welke misschien aanvankelijk voor de meeste leden der jonge Vereeniging verborgen is gebleven, maar reeds spoedig algemeene bekendheid kreeg en ook algemeen erkenning vond. Hoe was het in dien tijd in ons land gesteld met de publicatie van microbiologische onderzoekingen? Een publicatie in Nederlandsche tijdschriften in de Nederlandsche taal bezat geen groote waarde; een dergelijke publicatie werd in het buitenland gewoonlijk niet gelezen, althans slechts zelden in de internationale literatuur opgenomen. Evenmin was zulks het geval met verhandelingen, geplaatst in Nederlandsche periodieken, welke ook in een vreemde taal publiceerden. Naast de vele abonnementen op vaktijdschriften, waartoe hij reeds verplicht is, abonneert een buitenlandsch microbioloog van professie zich gewoonlijk niet op een periodiek, dat tal van artikelen brengt op terreinen van wetenschap, die hem niet

interesseeren, alleen nu en dan afgewisseld door enkele mededeelingen op microbiologisch gebied. In ieder geval, de ervaring had geleerd, dat een publicatie in een Hollandsch tijdschrift, welk dan ook, gewoonlijk geen voldoende bekendheid in het buitenland wist te verwerven, niet zelden zelfs geheel onopgemerkt bleef. Wij waren dan ook regelmatig genoodzaakt voor onze publicaties de gastvrijheid van buitenlandsche tijdschriften in te roepen. Onder deze omstandigheden is het begrijpelijk, dat de vereeniging van de verschillende microbiologen in ons land in één verband mede ten doel had zoodoende te kunnen geraken tot de stichting van een internationaal tijdschrift, waarin de publicaties van de gezamenlijke Nederlandsche onderzoekers op microbiologisch terrein een plaats zouden kunnen vinden. Eenigen van ons — en ik heb hier weder in het bijzonder ongeveer dezelfde personen op het oog, die ook den stoot tot de oprichting van onze vereeniging hebben gegeven, Beyerinck, Poels, Sleswijk en mijn persoon — gevoelden buitengewoon veel voor dit denkbeeld. Wij riepen de „Folia microbiologica” in het leven, waarin uitsluitend in de Fransche, Duitsche of Engelsche taal gepubliceerd werd. En reeds op de eerste wetenschappelijke vergadering te Delft werd door de Redactie met de Vereeniging een overeenkomst aangegaan, waarbij bepaald werd, dat alle verhandelingen der Vereeniging in het nieuwe tijdschrift zouden worden opgenomen en de „Folia” aan de leden kosteloos zouden worden toegezonden tegen vergoeding van een bepaald bedrag per lid uit de kas der Vereeniging. Op deze wijze werd een gezonde financieele basis voor de „Folia” geschapen en tevens zorggedragen voor de verspreiding van de Nederlandsche onderzoekingen op microbiologisch gebied in ruimen kring, ook buiten onze grenzen. Want de „Folia microbiologica” mochten zich van den aanvang af op een gunstige ontvangst in het buitenland verheugen; in betrekkelijk korten tijd nam het aantal abonnementen in den vreemde zoodanig toe, dat aan het voortbestaan van het tijdschrift niet meer getwijfeld behoefde te worden. Maar helaas, weinige jaren later staken geheel onvoorziene omstandigheden een spaak in het wiel. De wereldoorlog, die zoovele economische, maar ook wetenschappelijke waarden heeft vernietigd, werd ten slotte ook de oorzaak van den ondergang van de onder zulke gunstige voorwaarden aangevangen „Folia microbiologica”. Eerst rom-

melde het reeds in den boezem van onze Vereeniging zelf. Hyperneutrale menschen als de leden van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie uit den aard der zaak oorspronkelijk waren, werden ten slotte toch ook min of meer door de oorlogspsychose aangetast. Het betrof dan ook een voor dien tijd buitengewoon ernstig geval. Het titelblad van de „Folia microbiologica” bevatte namelijk naast den Latijnschen tekst, ook een tekst in de Deutsche taal en wel alleen in het Duitsch. Deze klaarblijkelijk hoogst onschuldige omissie is waarschijnlijk indertijd begaan, om een te uitgebreid en daardoor misschien iets minder aesthetisch titelblad te vermijden. Zoo-veel is zeker, dat in de voorafgaande jaren niemand over deze omissie gevallen is, niemand eenigerlei op- of aanmerking over het titelblad van de „Folia” had gemaakt. Maar in 1916 barstte de bom! Een zeer langdurig en dikwijls zelf venijnig debat werd over deze belangrijke kwestie in de Decemберvergadering van dat jaar gevoerd en eindigde met het voorstel, dat de redactie van de „Folia” verzocht zoude worden het titelblad een meer neutraal karakter te geven, zoodat aan geen der talen van een der strijdende volken eenige voorkeur werd geschonken. De redactie was hiertoe natuurlijk onmiddellijk bereid en plaatste in den vervolge naast den Latijnschen uitsluitend een tekst in de Nederlandsche taal op het titelblad. En hiermede was ten genoeege van alle strijdende partijen aan de neutraliteit voldaan.

Ernstiger waren de gevolgen van den wereldbrand voor het tijdschrift in een andere richting. Na 1916 toch liep het aantal abonnementen in het buitenland regelmatig zoodanig achteruit, dat het ten slotte geen zin meer had voor het klein aantal buitenlandsche lezers een dergelijk periodiek uit te geven. Door dezen achteruitgang werd bovendien de financieele grondslag van het tijdschrift ondermijnd. Na nog eenigen tijd een kwijnend bestaan gevoerd te hebben, was de redactie verplicht in 1919 de uitgave van de „Folia microbiologica” te staken. Een treurig einde na zulk een fraai begin, een lot trouwens, dat in de verarmde na-oorlogsche periode menig tijdschrift getroffen heeft.

Vijf en twintig jaren bestaat thans de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie, een lange periode in 's menschen leven. Dit blijkt wel uit het groot aantal leden, bij de oprichting van onze Vereeniging nog vol levenslust en vol arbeidskracht

in ons midden aanwezig, dat onze Vereeniging door den dood heeft moeten verliezen. Het is wel niet noodig hen allen hier met name te noemen; bij velen onzer staan hun personen nog zoo helder voor den geest, dat het geheel overbodig is een naam aan die herinnering te verbinden. Zij allen hebben met hun beste krachten in onze wetenschap gearbeid en hun namen zullen zonder twijfel te allen tijde met grooten eere in onze Vereeniging genoemd worden.

Wel past het mij op dezen voor onze Vereeniging zoo vreugdevollen herinneringsdag de groote figuren te herdenken, die hun bekwaamheden in dienst hebben gesteld van onze wetenschap en bovendien als voorzitter of in een andere bestuursfunctie in de allereerste en tevens allermoeilijkste jaren van het bestaan van onze Vereeniging de belangen van onze Vereeniging in zoo hooge mate hebben bevorderd. Een goede beschrijving van de grondvesting onzer Vereeniging zoude trouwens niet mogelijk zijn zonder hen, waar zij zulk een integreerend aandeel hebben gehad in den wetenschappelijken en practischen opbouw van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie. Beijerinck, Poels, Eykman, De Jong, mannen, die zoowel in binnen- als buitenland als vooraanstaande microbiologen erkenning vonden en die ontegenzeggelijk in het laatste decennium van de vorige en in de beide eerste decennia van deze eeuw een karakteristiek stempel op de Nederlandsche microbiologie hebben gedrukt. Hun groote verdiensten op wetenschappelijk gebied zijn indertijd geschetst op een wijze, welke door mij op dit oogenblik zeker niet verbeterd zoude kunnen worden. Ik heb daaraan dan ook niets toe te voegen. Maar bij een van deze groote figuren, zonder twijfel wel de grootste figuur, die onze Vereeniging gekend heeft, ben ik op dit zilveren jubileum wel verplicht eenige oogenblikken langer stil te staan, uit piëteit, maar ook, en in niet mindere mate, uit diepgevoelden en rechtmatigen trots. Deze uitzondering — gij weet het allen — betreft Beijerinck, de mede-oprichter van onze Vereeniging, haar eerste voorzitter, de mede-stichter van de „Folia microbiologica”, het eenige eerelid door onze Vereeniging met die waardigheid bekleed. Met het volste recht mag Beijerinck de „geestelijke” stichter van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie genoemd worden. Het lijdt wel geen twijfel, dat het groote succes, door onze Vereeniging reeds van den eersten dag af

van haar bestaan behaald, voor een niet gering deel toegeschreven moet worden aan het feit, dat een man als Beijerinck de eerste leiding van de jonge Vereeniging op zich wilde nemen. Want Beijerinck was toen reeds onze groote microbioloog en van algemeen erkende wereldvermaardheid. Nog kortelings werd daarop mijn aandacht gevestigd in een z.g. „News letter”, dien ik uit Amerika mocht ontvangen. Verschillende wetenschappelijke vereenigingen in Amerika hebben de gewoonte van tijd tot tijd „News letters” uit te geven, welke aan de leden der vereeniging worden toegezonden. Dergelijke „News letters” bevatten allerlei voor de leden der vereeniging interessante mededeelingen: historische herinneringsdagen, actueele wetenschappelijke gebeurtenissen, inlichtingen over verzamelingen, over boeken, over vergaderingen, over voorstellen van het bestuur, enz. Inderdaad zijn deze op overigens zeer eenvoudige en weinig kostbare wijze samengestelde „News letters” bijzonder geschikt den band tusschen de vereeniging en haar leden in de tijdperken, welke tusschen opeenvolgende vergaderingen verlopen, nauwer aan te halen. Welnu, in den aanvang van dit jaar ontving ik een „News letter” van de „Society of American Bacteriologists”, welke Society mij indertijd de eer bewees mij tot een van haar buitenlandsche leden te benoemen. Deze „News letter” vangt aan met een historischen kalender over de maand Januari, vermeldende derhalve eenige voor de wetenschap zeer belangrijke herinneringsdagen, welke in die maand vallen. En zoo lees ik reeds direct onder January 1, van het jaar 1931 „died Martinus Willem Beijerinck, Dutch biologist, „among whose important discoveries was that of the root „nodule bacteria in the leguminous plants in 1888”. Als tweede herinneringsdatum wordt vermeld January 10, van het jaar 1778, op welken datum de beroemde Zweedsche geneeskundige Linnaeus overleed; de derde herinneringsdag betreft 14 Januari 1929, het overlijden van den bekenden Franschen onderzoeker Fernand Widai, terwijl ten slotte de vierde herinneringsdatum, 23 Januari van het jaar 1896, betrekking heeft op den Duitschen natuurkundige Wilhelm Konrad Röntgen, die op dien dag op een vergadering van natuurkundigen te Würzburg mededeeling deed van de ontdekking der x-stralen.

Uit dezen kalender blijkt wel ten duidelijkste, dat zijn allereerste onderzoekingen op bacteriologisch gebied, welke handel-

den over de geslaagde isoleering van den verwekker der knolletjes aan de Leguminosenwortels, Beijerinck reeds in het jaar 1888 een wereldnaam hadden geschonken. Geen wonder, dat onze Vereeniging met Beijerinck aan het hoofd reeds onmiddellijk een groot deel der Nederlandsche microbiologen tot zich wist te trekken.

Een zijner leerlingen schreef indertijd in een necrologie, dat Beijerinck behoort tot de meest universeele en bekwaamste geleerden, die Nederland heeft voortgebracht. Bij dat universeele heeft die leerling klaarblijkelijk het oog gehad op de bekende plantaardige studiën van Beijerinck. Hugo de Vries, Melchior Treub en Martinus Beijerinck, drie namen, die een wereldklank hadden op botanisch gebied. En op microbiologisch terrein verrichtte Beijerinck baanbrekend werk; geniaal zijn bovenal de origineele methoden, welke hij bij zijn onderzoekingen in toepassing bracht. Zijn enorme levensarbeid is neergelegd in 5 deelen „Verzamelde Geschriften”, bij zijn aftreden als hoogleeraar uitgegeven. Maar ik behoef in deze vergadering de wetenschappelijke beteekenis van Beijerinck als microbioloog niet uiteen te zetten. Wat ik hier op dit oogenblik als persoonlijk getuige vooral wil gedenken, dat is het jeugdig vuur — ofschoon de 60 reeds gepasseerd — het enthousiasme, waarmee Beijerinck de vergaderingen van ons bestuur leidde, waarin de belangen van onze jonge vereeniging, de beteekenis van de „Folia microbiologica” voor de verspreiding van de Hollandsche literatuur, besproken werden. Een enthousiasme, alleen geëvenaard door dat voor zijn wetenschap, zooals zulks — en de ouderen onder ons zullen zich dat met mij herinneren — in zijn voordrachten en in de debatten in onze vergaderingen zoo veelvuldig tot uiting kwam. Men zoude bijna geneigd zijn de veronderstelling te wagen, dat misschien iets van den geheimzinnigen Delftschen geest, die eenige honderden jaren te voren Anthonie van Leeuwenhoek inspireerde, ook op Beijerinck was overgegaan. Helaas, Beijerinck heeft niet meer kunnen deelnemen aan de posthume hulde, welke onze Vereeniging, ter gelegenheid van de herdenking van den 300-jarigen geboortedag van Anthonie van Leeuwenhoek op 24 October 1932, in een speciaal aan dit doel gewijde vergadering aan de nagedachtenis van dien grondlegger der microbiologie bracht.

Zeër onlangs trof mij een opmerking door den bekenden

Amerikaanschen natuurkundige Robert A. Millikan gemaakt naar aanleiding van de vermelding van het feit, dat de Heer en Mevrouw Joliot-Curie den Nobelprijs hadden verworven voor hun ontdekking van de kunstmatige radio-activiteit. Millikan wees er n.l. op, dat 38 jaren vroeger, toen Mevrouw Joliot-Cury nog een baby was, haar ouders eveneens den Nobelprijs hadden gekregen voor de ontdekking van het radium. Hij stelde nu de vraag, en wat mogen wij nu nog verwachten van de derde generatie der Curie's, die thans reeds het levenslicht heeft aanschouwd? Ik kan de verleiding niet weerstaan een analoge vraag te stellen: na Anthonie van Leeuwenhoek en na Martinus Beijerinck, wat mogen wij nu nog in de toekomst voor de Nederlandsche microbiologie uit Delft verwachten?

En met deze vraag, Mijnheer de Voorzitter, wensch ik te eindigen, na de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie op haar zilveren jubileum van ganscher harte mijn gelukwensen te hebben aangeboden.

De verdere lotgevallen der Vereeniging ¹⁾

DOOR

Prof. Dr. P. C. FLU.

Zooals Prof. Klein reeds gelegenheid had om mee te deelen, werd onze Vereeniging 30 April 1911 te Groningen opgericht, onder den naam van Nederlandsche Vereeniging voor microbiologie.

Haar eerste Voorzitter, Prof. Beyerinck kon toen berichten, dat het aantal leden 38 bedroeg. Reeds op de tweede vergadering kon hij meedeelen, dat het ledental tot bijna 60 was gegroeid, in 1912 bedroeg dit 65, om in 1930 het maximum van 136 te bereiken.

De malaise in 1933 met haar gevolgen ging ook langs onze Vereeniging niet zonder sporen achter te laten. Het ledental liep tot 117 terug.

De slechte tijden noodzaakten velen het lidmaatschap op te zeggen en om aan het bezwaar dat vele jonge microbiologen, die door de moeilijkheden, die zij bij den strijd om het verwerven van een positie of wat als zoodanig kan worden beschouwd, niet zouden kunnen profiteeren van hetgeen onze Vereeniging hen te bieden had, tegemoet te komen, werd in de Vergadering van Mei 1934 het voorstel aangenomen om goedkoopere temporaire lidmaatschappen in te stellen. Men verkreeg hierdoor alle rechten van een gewoon lid met de uitzondering van gratis ontvangst van het orgaan der Vereeniging.

Slechts 4 temporaire leden gaven zich op.

Gelukkig bedraagt ons ledental nu weer 122, zoodat er goede en gezonde hoop is, dat het dieptepunt met 117 leden, in 1934

¹⁾ Voordracht gehouden ter gelegenheid van de herdenking van het 25-jarig bestaan der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie op Zaterdag 23 Mei 1936.

bereikt werd en wij nu weer een stijgende lijn van het leden-tal zullen kunnen constateeren.

Indien wij nu, bij de viering van de eerste kwarteeuw van het leven onzer Vereeniging, de balans der vervlogen jaren opmaken, dan mogen wij met gepaste voldoening op het gedurende dien tijd gepresteerde terugzien en mogen wij met frisschen moed en vol vertrouwen, ook al zijn de tijden helaas niet gunstig voor wetenschap en techniek, de toekomst tegemoet gaan.

Mij komt als Voorzitter de taak toe het èèn en ander van de lotgevallen gedurende deze 25 jaar mee te deelen.

Uit den aard der zaak is het leven, van een gezelschap als het onze, waar in een sfeer met een zekere deftigheid de leden over de resultaten van hun noesten arbeid en lastige experimenteer-kunst berichten, niet erg bewogen.

Bij het doorlezen der notulen, die door onze drie zoo verdienstelijke secretarissen, Sleeswijk, De Graaff en Van Nedeveen, uitstekend en uitvoerig zijn bijgehouden, wordt men getroffen door het feit, dat slechts bij hooge uitzondering de zakelijke stijl van het vermelden van den inhoud der voordrachten en de gevoerde discussie, wordt afgewisseld door korte zinsneden of passages, die doen zien, dat ook in onze deftige vereeniging niets zonder strijd, zonder botsing van meeningen, bereikt wordt.

Zoo is b.v. het orgaan, dat diende ter publicatie onzer mededeelingen steeds een onderwerp van strijd en discussie geweest.

Reeds op de tweede vergadering in November 1911 kon de Voorzitter Prof. Beyerinck mededeelen, dat er een vereeniging was opgericht, die zich ten doel gesteld had een Tijdschrift, de *Folia microbiologica*, uit te geven. In deze *Folia* zouden de mededeelingen en voordrachten der leden, benevens de discussie en de officiële berichten van de Vereeniging, vertaald in Duitsch, Engelsch of Fransch, een plaats kunnen vinden.

Leden der Vereeniging, die een contributie van *f* 10.— per jaar moesten betalen, zouden het Tijdschrift zonder betaling van het abonnement, dat *f* 10. —bedroeg, ontvangen. Als bijdrage in de kosten van het Tijdschrift zou de Vereeniging voor elk lid een bedrag van *f* 8.— per jaar moeten storten in de kas van het Vennootschap, dat de *Folia* zou uitgeven.

Jaren lang hebben de *Folia*, onder de krachtige en kundige

leiding van den Redacteur Professor Sleeswijk, een grooten bloei gekend. De voordeelen, die de leden genoten, die nu hun mededeelingen ook buiten de grenzen van Nederland ter kennis van vakgenooten konden brengen en bovendien in een geschikten vorm, alles wat op de Vergaderingen behandeld en opgemerkt was bij elkaar vonden, zijn niet te schatten en wij kunnen den initiatiefnemer niet anders dan dankbaar zijn voor het vele werk, dat hij heeft moeten verrichten, om jaren aaneen de Folia op tijd en in behoorlijken vorm te doen verschijnen.

In 1913 deelden stellig niet alle leden dit gevoelen. Er klonken toen stemmen, die de contributie der Vereeniging te hoog vonden en de hooge contributie aan de abonnementen op de Folia weten. De leden, die van deze meening waren, stelden voor het abonnement facultatief te stellen.

De Voorzitter, Prof. Eykman, die in 1913 Prof. Beyerinck was opgevolgd en die verder zag en een breedere opvatting huldigde dan de minderheid, die voor het facultatief abonnement voelde, bestreed het voorstel en wist, wijzende op de groote beteekenis van het bezit van een eigen orgaan, de Vereeniging te bewegen niet van het eenmaal na rijp beraad vastgestelde, af te wijken.

Prof. De Jong, die in 1916 na Prof. Eykman Voorzitter werd, bracht in de Decembervergadering van dat jaar weer de Folia ter sprake. Wij waren toen midden in den strijd, die de volkeren van Europa verdeelde in geëllieerden en centralen. Fel kwamen de personen, wier sympathiën voor de beide groepen niet gelijk waren, tegen elkaar op.

Het geval wilde nu, dat de tekst van het titelblad van de Folia in het Duitsch gesteld was. De Voorzitter vond dit niet in overeenstemming met de positie, die Nederland als neutrale staat innam en wenschte wijziging van deze gewoonte.

De notulen van de vergadering, waarin deze kwestie besproken werd, zijn de eenige, waarin men iets van het temperament en ook van de sympathiën der leden kon bespeuren, maar gelukkig won het nuchtere verstand het van de harts-tochten en op goed Nederlandsche manier werd de kwestie commissoriaal gemaakt. In de daarop volgende vergadering werd besloten, dat voortaan de titel in het Nederlandsch zou worden gesteld en dat de publicaties in een der drie talen (Duitsch, Engelsch of Fransch), de redactioneele mededeelingen, in alle drie talen zouden verschijnen.

De Folia waren echter ook hiermede niet te redden. In de Vergadering van December 1919 werd meegedeeld, dat de Folia hadden opgehouden te bestaan. Het Bestuur gaf uiting aan zijn groote spijt over dit feit en sprak woorden van waardeering voor den Redacteur.

De Vereeniging blijft daarna gedurende een jaar zonder orgaan, maar vindt in het Tijdschrift voor Vergelijkende Pathologie, dat onder Redactie van Prof. De Jong verscheen, gast-vrijheid.

Tot 1925 blijft dit zoo, en als De Jong in 1925 sterft en het orgaan, dat door hem persoonlijk werd gefinanciëerd, eveneens dreigt op te houden te verschijnen, is het de Secretaris, Prof. De Graaff, die een eigen orgaan voor de Vereeniging behoudt door het Tijdschrift voor vergelijkende pathologie op anderen basis om te zetten in een Nederlandsch Tijdschrift voor Hygiëne, Microbiologie en Serologie.

Dit Tijdschrift, uitgegeven door de Firma Van Doesburg, trad in de plaats der Folia en werd, evenals dit blad, sedert 12 December 1928 officieel orgaan der Vereeniging.

Rust beteekende dit echter nog niet. Er kwamen tal van klachten over te laat en ongeregeld verschijnen van de afleveringen. De tweede en vierde aflevering waren bestemd voor het opnemen van de verhandelingen van respectievelijk de Zomer- en Wintervergadering, de beide andere afleveringen zouden dienen voor vrije mededeelingen.

Aan de leden, die in het Tijdschrift publiceerden, zouden kosteloos overdrukjes ter beschikking worden gesteld.

Hoewel men vol waardeering was voor het werk van den Redacteur Prof. De Graaff, maar niet geheel tevreden met de wijze van uitgaaf, bleef men toch bij de firma Van Doesburg, omdat men het Tijdschrift als officieel orgaan wenschte te behouden.

Toen de klachten bleven binnenkomen en uit de Vergadering het verlangen naar voren kwam het vraagstuk nog eens te bestudeeren, kon het Bestuur niet anders dan aan dit verlangen voldoen.

In de Vergadering van 28 Juni 1933 werd tenslotte besloten de overeenkomst met de firma Van Doesburg niet te verlengen. Op 18 November 1933, onder Voorzitterschap van Prof. Schüffner, werd het voorstel om een eigen orgaan „Anthonie

van Leeuwenhoek", Nederlandsch Tijdschrift voor Hygiëne en Microbiologie en Serologie uit te geven, met een meerderheid van stemmen aangenomen.

Het nieuwe Tijdschrift zou onder Redactie van Prof. De Graaff blijven en bij de Firma Swets en Zeitlinger worden uitgegeven. Prof. De Graaff, die het niet in alle deelen eens was met de argumenten der leden, die deze verandering wenschten, verdient groote erkentelijkheid van onze Vereeniging door zijn besluit over dit alles heen te stappen en als Redacteur aan te blijven en zijn onschatbare diensten aan ons Orgaan, nu samen met Dr. W. Aeg. Timmerman, te wijden.

Zoo blijkt, dat het probleem „eigen orgaan" oorzaak is geweest van veel beroering en het is te hopen, dat er nu eindelijk wat stabiliteit in ons publicatie-orgaan komt.

Een ander punt, dat in de notulen dikwijls ter sprake komt, is dat der contributie. Men vindt deze reeds spoedig na de oprichting te hoog. Men zocht eerst de schuld in de dure Folia als in 1919 weer eens over de hooge contributie van *f* 10.— per jaar geklaagd wordt en men de Folia hiervoor niet langer verantwoordelijk kan stellen; daar deze toch juist opgehouden hadden te bestaan, wordt het de lunch, die volgens de kritiek oefenende leden de contributie zoo hoog maakte. Bij de eerste vergaderingen der Vereeniging met een betrekkelijke geringe opkomst, werd de lunch nu eens aangeboden door den Voorzitter, dan weer en dan meest gezamenlijk door de leden, die woonden ter plaatse van de bijeenkomst.

In de Vergadering van 1 Juli 1914 vroeg de Voorzitter voor het eerst machtiging de onkosten voor den lunch te bestrijden uit de kas. Er was een overschot en als men de lunch wel degelijk maar eenvoudig hield, zou de kas deze uitgaaf best kunnen lijden.

Het voorstel de lunch niet langer aan te bieden, maar elk lid voor zijn portie te doen betalen, viel waarschijnlijk niet in goede aarde. De notulen vermelden niets van het lot, dat dit voorstel trof. Uit het feit, dat in dezelfde notulen werd opgeteekend, dat de leden zich aan een gastvrij maal gezellig vereenigden, moet ik besluiten, dat het viel, wat maar goed was.

Hiermede is het voornaamste, ja bijkans alles meegedeeld,

dat in staat was de kalme rust onzer Vergaderingen te schokken.

De rest van den beschikbaren tijd bleef geheel voor het werk bewaard en wel mogen wij hierop met eenige voldoening terugzien. De leiding van onze Vereeniging, die direct na haar oprichting in de kundige handen van Prof. Beyerinck werd gelegd, werd na 1913, toen onze eerste Voorzitter aftrad, overgenomen door Prof. Eykman (1913—1916), daarna achtereenvolgens door Prof. De Jong, Dr. Broers, Prof. Söhngen, Prof. Gorter, Prof. Kluyver en Prof. Schüffner. Van deze acht Voorzitters zijn reeds vijf van ons weggenomen.

Wij eeren hun nagedachtenis en blijven hun erkentelijk voor alles wat zij voor ons als hun nazaten hebben gedaan.

Zeker vervult de Secretaris een belangrijke plaats en wel de belangrijkste in het Bestuur eener Vereeniging. Is de Secretaris niet actief, niet vol toewijding voor de dikwijls zware en ondankbare taak, die hij geheel belangeloos op zich neemt, dan is dat reeds spoedig aan alles wat de Vereeniging raakt te bespeuren.

De belangrijke taak van den Secretaris werd reeds spoedig door ons Bestuur ingezien. In 1915 werd besloten, dat niet meer, zooals tot dat jaar gebruikelijk, elk jaar een bestuurslid moest aftreden en dat door loting bepaald werd, wie dat lot zou treffen, maar dat nieuw benoemde leden onder aan de lijst zouden komen te staan en elk jaar het lid, dat het langst Bestuurslid was, zonder herkiesbaar te zijn, voor een ander zou plaats maken. Een uitzondering hierop maakte alleen de Secretaris. deze was weer herkiesbaar, omdat men deze functionaris voor het behoud van de continuïteit zoo lang mogelijk in het Bestuur wilde houden.

Onze eerste Secretaris, Prof. Sleeswijk, bekleedde deze functie vanaf de oprichting der Vereeniging in 1911 tot 1919. De tweede secretaris, Prof. De Graaff, van 1919 tot 1926 en vanaf dat jaar tot heden profiteert onze Vereeniging van de werkkraft van onzen tegenwoordigen secretaris, Dr. Van Nederveen.

Gelukkig verkeerden onze oud-secretarissen onder de levenden, en kan ik nog eens den dank uitspreken, die zij verdiend hebben en die hun bij hun aftreden werd gebracht.

Onze tegenwoordige secretaris heeft van allen wel het langst deze zoo gewichtige functie bekleed en als hij in 1937 aftreedt, zal hij zich niet meer herkiesbaar stellen. Wie, zooals ik, zoo dikwijls van den ijver en de toewijding van den heer Van Neder-

veen, waar het de belangen van onze Vereeniging betreft, heeft kunnen kennis nemen, zal begripen, dat ik het oogenblik van zijn aftreden met becommernis tegemoet zie. Het zal niet gemakkelijk vallen een goede plaatsvervanger voor hem te vinden, maar ook al mocht dat, wat ik van ganscher harte hoop en wat ook hij zeker wenschen zal, geschieden, nooit zal die plaatsvervanger ons doen vergeten wat wij aan de tien jaar lange werkzaamheid van Dr. Van Nederveen verschuldigd zijn. Beste Van Nederveen, hooggeachte Secretaris, mag ik U op dezen jubeldag van onze Vereeniging ons aller dank brengen voor wat U voor de Vereeniging en dus middellijk voor ons allen gedaan hebt.

Ik heb zooveel mogelijk vermeden in dit overzicht van de lotgevallen onzer Vereeniging cijfers te vermelden en zal mij, nu ik dit toch doen moet, zooveel mogelijk beperken, wat mede met het oog op den tijd noodig is.

Gedurende de 25 jaar van ons bestaan werden er, de demonstraties niet meegerekend, 222 voordrachten gehouden; 175 dezer voordrachten behandelden een onderwerp, dat van meer speciale strekking was voor het onderdeel der microbiologie, dat door den voordragende werd beoefend, terwijl 47 dier voordrachten betrekking hadden op een algemeen onderwerp der microbiologie.

Als ik, om te groote breedsprakigheid te vermijden, de leden onzer Vereeniging mag indeelen in drie groepen, n.l. medicibacteriologen, diergeneeskundig-bacteriologen en bacteriologen van de richting Delft en Wageningen, en onder deze laatste groep ook de pharmaceuten, chemici en botanici samenvat, en dan naga, hoe de voordrachten over de verschillende groepen verdeeld waren, dan zien wij, dat van deze 222 voordrachten 118 gehouden werden door de groep der medici, n.l. 96 vakvoordrachten en 22 voordrachten van algemeenen aard; door de groep Delft en Wageningen werd gehouden 82 voordrachten n.l. 62 vakvoordrachten en 20 voordrachten van algemeenen aard en door de groep diergeneeskundigen 22 voordrachten en wel 17 vakvoordrachten en 5 van algemeenen aard.

Onze werkzaamheden bleven evenwel niet hiertoe beperkt. Dikwijls was een vergadering aan de bespreking van een bepaald onderwerp gewijd. Zoo in Juni 1914 aan de bespreking

van de microbiologie der tuberculose, in 1915 aan de diagnose van de diphtherie en in 1918 aan de bespreking van de waarde der quantitatieve reactie van von Wassermann.

Ook buitenlandsche sprekers werden door ons uitgenoodigd, helaas, om de kosten een te gering aantal en zeker ook, omdat ons programma veelal zoo overladen is, dat wij een speciale vergadering zouden moeten uitschrijven om buitenlanders gelegenheid te geven ons persoonlijk over de problemen, die zij zich bij hun werk stellen, in te lichten.

In 1929 luisterden wij naar Prof. Ramon van het Instituut Pasteur te Parijs, die een voordracht hield: *Sur l'anatoxine et l'immunité antitoxique en général*. In 1924 naar Félix d'Hérelle, die zijn werk en zijn ontdekking van den bacteriophage besprak, en in 1927 hield Prof. Doerr uit Bazel een voordracht „Ueber Ultravirus”.

Ook speciale herdenkingsfeesten werden uitgeschreven, indien het ging om het eeren van de nagedachtenis van mannen, die voor de microbiologie van fundamenteele beteekenis waren geweest.

Ik herinner aan de herdenking van den honderdjarigen geboortedag van Louis Pasteur in November 1922, toen Prof. Dr. N. L. Söhngen een voordracht hield „Eenige mededeelingen over het leven en het werk van Louis Pasteur”, en Prof. Dr. D. A. de Jong over Pasteur en de geneeskunde sprak.

De vergadering van Maart 1932 was gewijd aan de herdenking van Robert Kochs ontdekking van den tuberkelbacil. Dr. Delprat haalde eenige persoonlijke herinneringen op, aan den grooten dag, toen Koch zijn ontdekking bekend maakte, Prof. Dr. J. J. van Loghem vatte in het kort samen, hetgeen Koch op 24 Maart 1882 in het Physiologisch gezelschap te Berlijn heeft meegedeeld.

In hetzelfde jaar werd op 12 November 1932 te Delft, de plaats waar Van Leeuwenhoek geboren, geleefd en gewerkt had, dezen grooten Nederlander, die driehonderd jaar voordien op 24 October werd geboren, geëerd. Prof. Dr. A. J. Kluyver gaf aan de hand van lantaarnplaatjes in korte trekken een overzicht van het werk van Van Leeuwenhoek.

Tenslotte nog een laatste opmerking over de notulen.

Bij de lezing der notulen en de bestudeering van den inhoud der voordrachten, wordt men goed doordrongen van het groote

belang, dat voor de werkers op verschillend gebied der microbiologie moet zijn gelegen in de mogelijkheid, die hun door een vereeniging als de onze geboden wordt om van elkaars methoden van werken en van de verschillende gedachtengang bij het experiment en de opzet hiervan kennis te nemen.

Het zal velen Uwer zoo gaan, zooals het mij gaat, die steeds na een vergadering, als ik voordrachten verschillend gebied rakend, heb aangehoord met een gevoel van groote voldoening en dankbaarheid, weer huistoe ga, om de volgende vergadering af te wachten. Dikwijls dankbaar voor een anderen kijk, die mij op mij interesseerend gebied gegeven werd.

Dames en heeren, ik ben aan het eind van de opsommingen der lotgevallen onzer Vereeniging, maar ik zou onvolledig zijn, indien ik aan het eind niet een groep van personen vermeldde, die voor den bloei onzer Vereeniging onmisbaar is en deze groep wordt gevormd door de leden zelf.

Ik heb eens, het was op een studentensocieteit, iemand hooren vragen, wat een Universiteit zou zijn zonder professoren, waarop een ondeugend maar volkomen logisch denkende student repliceerde met de wedervraag, wat professoren voor beteekenis zouden hebben, indien er geen studenten waren.

Met een variant zouden wij kunnen vragen, wat van onze Vereeniging was terecht gekomen, indien zij niet onder haar leden zooveel stoere werkers telde, die niet alleen werkten, maar ook steeds bereid waren ons in meestal degelijk voorbereide voordrachten over hun interessant werk het meest wetenswaardige mee te deelen.

U te danken voor hetgeen U in de gepasseerde 25 jaren Uwe medeleden bood en U op te wekken ook in de toekomst in deze richting door te gaan, is mij een aangename taak.

Dames en Heeren, zoo wil ik dan eindigen met den wensch: Dat onze vereeniging nog lang leve en bloeie.

De wereld der microben: verleden, heden en toekomst ¹⁾

DOOR

A. J. KLUYVER.

Uitgenoodigd om op den feestdag van heden een onderwerp van algemeenen aard voor U te bespreken, leek het mij passend een oogenblik te verwijlen bij de indrukken, welke men verkrijgt, wanneer men er naar streeft de wereld der microben in haar geheel aan zijn geestesoog te laten voorbijgaan. Terwijl de beide voorafgaande sprekers terecht Uw aandacht hebben gevraagd voor de daden der microbiologen, die onze vereeniging hebben gesticht, respectievelijk haar tot bloei hebben gebracht, is het toch slechts billijk mede uit te spreken, dat het hiernaast de kleinste levende wezens zelve zijn, welke aan ons vereenigingsleven ten grondslag liggen.

Wanneer ik in het hierna volgende zal trachten U eenige algemeene indrukken van de microbenwereld weer te geven, dan moet ik tevoren op twee dingen wijzen. En wel, dat mijn uiteenzettingen in het gegeven tijdsbestek slechts oppervlakkig kunnen zijn en voorts, dat mijn titel ook hierom te wijdsch is, omdat ik mij in hoofdzaak tot de bacteriën zal beperken.

Beschouwen wij dan allereerst, wat er bekend is aangaande *het verleden* der ons heden ten dage omringende microbenwereld. Onmiddellijk rijst dan de vraag, of in de ontwikkelings-

¹⁾ Voordracht gehouden ter gelegenheid van de feestelijke herdenking van het 25-jarig bestaan der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie op Zaterdag 23 Mei 1936. Bij de voordracht is er naar gestreefd de behandelde stof te verlevendigen door het synchroon projecteeren van een reeks lantaarnplaatjes, welke betrekking hadden op de achtereenvolgens besproken onderdeelen.

geschiedenis van het leven op aarde de microben reeds vroegtijdig haar intrede hebben gedaan. Ten nauwste is hiermede uiteraard verbonden de meer algemeene vraag naar de herkomst van het leven op aarde. Dit vraagstuk blijve hier intusschen onbesproken. Voor het heden gestelde doel moge het voldoende zijn aan twee zaken te herinneren. Eenerzijds, dat volgens het nagenoeg eensluidend oordeel der geologen de aarde eens een gloeiend lichaam was, waarop alles, wat zich met onze tegenwoordige voorstelling van leven dekt, onbestaanbaar was. Anderzijds is er het door een rijk feitenmateriaal gedocumenteerde inzicht der biologen, volgens hetwelk het leven op aarde door een geleidelijke ontwikkeling van eenvoudige levensvormen tot zulke met sterker gedifferentieerden bouw is gekenmerkt. Hoezeer de biologie ook heden ten dage nog in het duister moge tasten aangaande de factoren, welke bij deze ontwikkeling werkzaam zijn, nochtans laten de convergeerende uitkomsten der palaeontologie, vergelijkende anatomie, embryologie en serologie geen twijfel aangaande de realiteit eener dergelijke evolutie.

Met dit algemeene gezichtspunt voor oogen wordt het reeds dadelijk waarschijnlijk, dat microben — en meer in het bijzonder ook bacteriën — tot de eerste bewoners der eenmaal afgekoelde aarde zullen hebben behoord. En deze waarschijnlijkheid wordt nu nog aanmerkelijk versterkt, wanneer wij hierbij realiseeren, dat in geen enkel ander onderdeel der levende natuur een dergelijke mate van aanpassing aan uiteenlopende uitwendige factoren wordt aangetroffen, als juist in het bacteriënrijk. Hier toch vinden wij nog heden ten dage vormen, aan wier voeding en vermeerdering chemische systemen ten grondslag liggen, welke voor alle andere levende wezens ten eenenmale onaanvaardbaar zijn.

Verplaatsen wij ons in dit verband een oogenblik in de voorwaarden, welke op aarde heerschten, onmiddellijk nadat de aardkorst tengevolge der ingetreden afkoeling een temperatuur had aangenomen, welke het leven, zooals wij dit kennen, toelaat. Wij kunnen dan bezwaarlijk aan de conclusie ontkomen, dat kenmerkend voor den toen bestaanden toestand zullen zijn geweest: volledige afwezigheid van vrije zuurstof en de omstandigheid, dat alle koolstof in den hoogsten oxydatietoestand, d.w.z. als vrij of gebonden koolzuur, aanwezig zal zijn geweest.

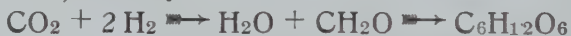
Bovendien bestaat er aanleiding om op gezag van *Arrhenius* te aanvaarden, dat te dien tijde een dichte nevel nog de aarde omgaf, waardoor geen lichtstraal vermocht door te dringen.

Een en ander zal voldoende zijn om de meeste onderzoekers te doen besluiten, dat onder deze voorwaarden nog geen leven op aarde bestaanbaar was. Het is nu voor den microbioloog verkwikkend te realiseeren, dat desniettemin reeds toen ontwikkeling van bepaalde microbenvormen, welke nog heden ten dage wijd en zijd verspreid worden aangetroffen, volkomen mogelijk was. Groot toch is de waarschijnlijkheid, dat van den aanvang af in gevolge der vulkanische werkingen waterstofgas als transporteur van den gereduceerden toestand van de aardkern naar de atmosfeer is opgetreden.

Het systeem koolzuur—waterstof eenmaal gegeven zijnde, waren ook de levensvoorwaarden verwezenlijkt voor de ontwikkeling der methaanbacteriën. Aan wijlen ons medelid en oud-voorzitter *Söhngen* ¹⁾ danken wij toch het belangrijke experimenteele bewijs, dat althans sommige dezer bacteriën aan een tusschen beide genoemde gasen zich voltrekend chemisme



haar levensenergie kunnen ontleenen. Een minder vergaand reductieproces, namelijk:



kan hierbij tot de vermeerdering van organisch celmateriaal, bij aanwezigheid van ammoniak ook tot die van het celeiwit, hebben geleid.

In aanmerking nemende, dat later door *Groenewege* ²⁾ methaanbacteriën zijn gevonden, welke den eenvoudigst denkbaren vorm, den bolvorm, bezitten, is het verleidelijk deze methaancoccen, welke in het laatste jaar door *Barker* in het Delftsche laboratorium nader zijn onderzocht, als directe nakomelingen van archaische levensvormen te beschouwen. ³⁾

Terwijl de omzetting van anorganische koolstof in organisch

¹⁾ *N. L. Söhngen*, Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder den invloed van het organische leven. Delft, 1906.

²⁾ *J. Groenewege*, Ann. d. Jardin Bot. de Buitenzorg. 2, 203, 1920.

³⁾ Recente onderzoekingen hebben aangetoond, dat het vermogen van bacteriën om koolzuur in hun stofwisseling te betrekken, ook bij verschillende thans algemeen als heterotrooph beschouwde vormen niet ontbreekt. Men vergelijkte hiervoor: *H. G. Wood* and *Ch. H. Werkman*, Biochem. Journ. 30,

materiaal dus aanvankelijk gebonden was aan de chemische energie, welke belichaamd was in de uit de aardkern ont-wijkende waterstof, gansch andere mogelijkheden ontstonden op eenmaal, toen geleidelijk ook het zonlicht tot de aardkorst doordrong. Het bestaan der zoogenaamde groene en purperen zwavelbacteriën doet het waarschijnlijk zijn, dat het vermogen om de lichtenergie in het stofwisselingsproces te betrekken reeds spoedig bij de eenvoudigste ééncelligen is opgetreden. Het is wederom aan een lid onzer vereeniging, namelijk aan *van Niel* ⁴⁾, dat wij een dieper inzicht danken in de karakteristieke stofwisseling van de vertegenwoordigers van deze groepen. Dank zij diens onderzoekingen weten wij, dat wij deze stofwisseling aldus mogen interpreteren, dat de betreffende organismen er met behulp der opgevangen lichtenergie in slagen het koolzuur te reduceeren met de in zwavelwaterstof aanwezige gebonden waterstof. Voor de purperen zwavelbacteriën blijken voorts de hierbij gevormde zwavel, alsmede de ten deele in vulkanische gassen eveneens voorkomende lagere oxydatie-trappen van dit element (in gehydrateerden toestand) in dit opzicht evenzeer bruikbaar.

Hiernaast mogen wij besluiten, dat zij geleidelijk ook het vermogen hebben verworven om het weliswaar aanvankelijk nog slechts schaars vertegenwoordigde doode organische materiaal als waterstofdonator voor de photo-chemische koolzuurreductie te benutten.

Ook de organismen van deze groep kunnen dus reeds een opbloei hebben vertoond vóór het oogenblik, waarop de vrije zuurstof haar intrede op aarde deed. Anderzijds ligt het voor de hand te besluiten, dat zij indirect hiervoor juist verantwoordelijk zijn geweest. Wanneer men het chemisme der photo-chemische koolzuurreductie door de gekleurde zwavelbacteriën beschouwt:



48, 1936 en D. D. Woods, *Biochem. Journ.* 30, 515, 1936, alsmede de belangwekkende door *Dr. K. Wieringa* in de ochtendvergadering gerapporteerde onderzoekingen. In hoeverre wij uit de door genoemde onderzoekers verkregen resultaten moeten besluiten, dat ook de door hen onderzochte soorten en wellicht nog vele andere cellen tot de facultatief autotrophen moeten worden gerekend, laat zich momenteel nog niet beoordeelen.

⁴⁾ *C. B. van Niel*, *Archiv f. Mikrobiol.* 3, 1, 1931.

dan beseft men, dat deze organismen als het ware bij voortdurend in de verleiding moeten zijn geweest een andere, aan het H_2S zeer na verwante, in quantitatief opzicht echter veel belangrijker, waterstofdonator aan te boren, namelijk het H_2O .

Onderzoekingen uit de laatste jaren hebben ons de groote overeenkomst geleerd in de chemische constitutie der kleurstoffen, welke eenerzijds het licht in staat stellen in de levende cel een dehydrogenatie van het H_2S , anderzijds een van het H_2O volgens het chemisme:



te bewerken.

De kleine verschuiving in configuratie der kleurstoffen, welke tot het aanboren van deze nieuwe levensbron noodig is, bracht evenwel een revolutie in de bestaansvoorwaarden van het leven met zich. Het systeem koolzuur—water wordt op aarde onder zulke uiteenlopende voorwaarden aangetroffen, dat zich voor de ééncellige chlorophylhoudende organismen evolutionnaire mogelijkheden boden, waarvan wij de resultaten heden ten dage in de haast oneindige verscheidenheid der groene plantenwereld zien gerealiseerd.

Toch was dit nog niet het eenige, wat de geboorte van het eerste chlorophylmolecuul tengevolge had. Immers deze bracht ons ook de zuurstof en hiermede de bestaansmogelijkheid van levensvormen, wier energievoorziening op de dehydrogenerende tendenties van deze stof zijn gebaseerd. Met andere woorden de mogelijkheid van de ontwikkeling van de overgroote meerderheid van de ons heden bekende bacteriën- en schimmelsoorten, maar hiernaast vóór alles ook van het dierlijk leven was geboren.

Waterstofdonatoren, welke tot dusver slechts met medewerking van het licht konden worden ontsloten, zooals zwavelwaterstof, lagere zwaveloxyden en vóór alles ook de organische stof der afgestorven organismen, werden hierdoor met één slag ook in het donker toegankelijk. Geheel nieuwe waterstofdonatoren, zooals ammoniak, nitrieten, ferro-ijzerverbindingen, welke ook in het licht inert waren gebleven, bleken in combinatie met zuurstof voor de omzetting van koolzuur in organisch materiaal bruikbaar.

De gelijkwaardigheid van licht en van zuurstof wat betreft hun levenonderhoudende werking, tezamen met de overweging,

dat de vrije zuurstof haar ontstaan op aarde aan het licht dankt, leidt er toe genoemd gas tot op zekere hoogte als „geconserveerd licht” te beschouwen. Het is zeker belangwekkend in dit verband te memoreeren, dat *van Niel* reeds in 1925 kon aantoonen, dat de ontwikkeling van vertegenwoordigers van een bepaalde ondergroep der purperbacteriën, n.l. die der zoogenaamde *Athiorhodaceae*, in bepaalde eenvoudige voedingsmedia al naar believen door het toe laten treden van licht dan wel van „lucht” (zuurstof) is te bewerkstelligen.

Aan deze schets van de ontwikkelingsmogelijkheden der verschillende microbengroepen is nu nog slechts toe te voegen, dat het nauwelijks verwondering kan baren, dat bepaalde vormen, welke zich aan de verwerking van doode organische stof met behulp der zuurstof hadden aangepast, geleidelijk er in slaagden den natuurlijken weerstand, welken het levende organisme tegen indringende vreemde levensvormen biedt, te overwinnen, tengevolge waarvan de bron der in het aangevallen organisme aanwezige organische stof vroegtijdig toegankelijk werd. Zoo werd het parasitisme geboren in hare rijke schakeering van doodelijke ziekte tot het somtijds zelfs aan beide partijen zegenbrengende compromis der symbiose.

Al het voorafgaande kan uiteraard niet meer zijn dan een uiteenzetting van het feit, dat de voorwaarden voor de ontwikkeling van uiteenlopende microbengroepen reeds in de eerste ontwikkelingsfasen eener uitwendig afgekoelde aarde aanwezig waren. Als verrassend feit is daarbij naar voren gekomen, dat naar alle waarschijnlijkheid deze voorwaarden reeds waren gerealiseerd op een tijdstip lang voordat ook voor hogere organismen de bestaansmogelijkheid was gegeven.

Dit behoeft intusschen niet noodzakelijkerwijze in te sluiten, dat de microben ook inderdaad zulke oude geboorterechten kunnen doen gelden. Het blijft denkbaar, dat bacteriën, schimmels enz. hun intrede eerst deden toen de evolutie der chlorophylhoudende cellen reeds een zekere trap van ontwikkeling had bereikt.

Om deze reden is het van belang na te gaan of er geen meer directe aanwijzingen voor den hoogen ouderdom der bacteriën zijn te vinden. Deze zijn nu onmiskenbaar aanwezig in de uitkomsten van het palaeontologisch onderzoek. In het beschouwde verband is het zeker van groote beteekenis, dat in „Dünn-

schliffe" van sommige gesteenten bij passend microscopisch onderzoek elementen worden aangetroffen, wier identificatie als gefossileerde bacteriën in vele gevallen onafwijsbaar is.

Reeds in afzettingen afkomstig uit een der oudste geologische tijdperken, n.l. het Algonkium, is het voorkomen van bacteriën door *Walcott*⁵⁾ aangetoond. Terwijl deze onderzoeker in den door hem onderzochten kalksteen slechts coccus-vormige bacteriën aantrof, rapporteert *Gruner*⁶⁾ het voorkomen van hooger ontwikkelde vormen, zooals verschillende scheede-vormende draadbacteriën en staafvormige bacteriën in vuursteen (hoornsteen) gevonden in algonkische ijzerertsafzettingen. Uitgebreide waarnemingen over het voorkomen van bacteriën in de verschillende aardlagen danken wij aan *Renault*⁷⁾, die tal van gefossileerde bacteriën kon aantonen in afzettingen, zoowel uit het Palaeozoicum als uit het Mesozoicum, n.l. in lagen respectievelijk behorende tot het Devoon, Carboon, Perm en Jura. *Renault* beschrijft zoo'n verscheidenheid van soorten, dat de door hem ingevoerde palaeobacteriologische nomenclatuur in hare verschrikkingen herinnert aan die van *Bergey* voor de recente vormen. In hare consequenties is intusschen *Renault's* naamgeving van heel wat onschuldiger aard! Ook door *Ellis*⁸⁾ zijn fossiele bacteriën beschreven uit ijzerhoudende afzettingen uit het Krijt-tijdperk.

Een bijzondere vermelding verdient ongetwijfeld de recente publicatie van *Rippel*⁹⁾ over het voorkomen van bacteriën in uit het Perm dateerende zoutafzettingen. Deze onderzoeker kon toch door onder passende voorzorgen in oplossing brengen van de bewuste zoutmonsters, gevolgd door centrifugeeren der verkregen oplossingen, bacteriën in handen krijgen, welke niet waren gefossileerd, doch eenvoudig in het droge zout waren geconserveerd. Hoewel *Rippel* dit niet vermeldt, moet het een aangrijpend oogenblik zijn geweest, toen bleek, dat het protoplasma van deze toch wellicht 20.000.000 jaren oude bacteriën geheel dezelfde affiniteit tot de gebruikelijke kleurstoffen ver-

⁵⁾ *Ch. D. Walcott*, Proc. Nat. Acad. Sciences Washington 1, 256, 1915.

⁶⁾ *J. W. Gruner*, Economic Geology 17, 407, 1922.

⁷⁾ *B. Renault*, Ann. d. Sciences Natur. 8me Série, Bot. 1, 275, 1895; Bull. d. l. Soc. de l'Industrie Minérale 3me Série, 13, 1899 et 14, 1900.

⁸⁾ *D. Ellis*, Proc. Roy. Soc. of Edinburgh 35, 110, 1915.

⁹⁾ *A. Rippel*, Archiv f. Mikrobiol. 6, 350, 1935.

toonde als dat onzer hedendaagsche vormen. Er werden dan ook uitstrijkpraeparaten verkregen, welke van die van recente grondsuspensies niet essentieel verschilden!

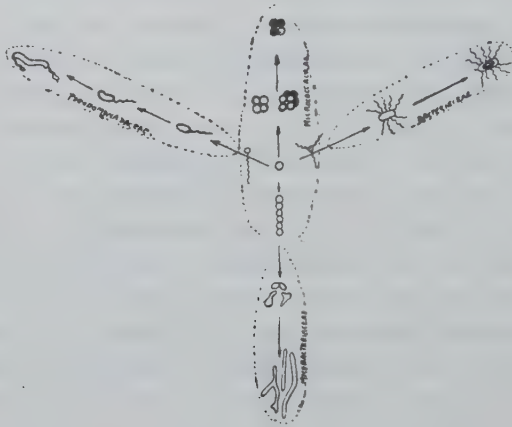
In de meeste der eerder beschreven gevallen was de aangetroffen bacteriënfloora ongetwijfeld werkzaam bij de afbraak van afgestorven plantendeelen uit de betreffende perioden en zoowel *Renault* als *Ellis* geven verschillende afbeeldingen, waaruit men inderdaad zou besluiten, dat de fossileerende werking van het kiezelzuurhoudende water talrijke bacteriënenindividuen als het ware op heeterdaad heeft betrapt. In aansluiting hierop is het nu zeker van belang, dat de palaeontologische gegevens evenmin nauwelijks twijfel laten, dat ook het parasitisme reeds geruimen tijd vóór de historische tijdrekening haar intrede heeft gedaan. Zoo vindt men aangegeven, dat gevallen van chronische osteomyelitis van de ruggegraat onmiskenbaar zijn teruggevonden bij een reptiel, *Dimetrodon*, dateerende uit het Perm, terwijl bij de overblijfselen van een krokodil uit het Jura eveneens onmiskenbare teekenen van bacterieele infectie zijn geconstateerd. Tand-caries schijnt bij tal van fossiele dieren niet minder zelden te zijn opgetreden dan bij de hedendaagsche menschheid.

Al het voorafgaande moge voldoende zijn om te besluiten, dat de microbenwereld in haar tegenwoordig bestaande verscheidenheid zeker even oude, en waarschijnlijk zelfs nog heel wat oudere, adelbrieven kan overleggen als de wereld der macroscopisch zichtbare organismen.

Alvorens intusschen van het verleden af te stappen, is het verleidelijk nog even onder de oogen te zien, in hoeverre de beschikbare palaeontologische gegevens zich er toe leenen ons een inzicht te geven in de evolutie, welke zich ook in den vorm der bacteriënen geleidelijk zal hebben voltrokken. Terwijl deze gegevens in bepaalde gevallen voor verschillende hogere organismen, zooals b.v. het paard en de rhinoceros, ontwikkelbare resultaten hebben opgeleverd, zijn de palaeobacteriologische vondsten hiervoor zeker nog te schaarsch. Toch trekt het de aandacht, dat *Renault* — de onderzoeker, die zeker over de grootste ervaring op dit gebied beschikt — met nadruk wijst op het relatief overheerschen van den bolvorm in het bijzonder ook in de oudere door hem onderzochte lagen.

Een en ander mag wellicht worden beschouwd als een nadere

aanwijzing ten gunste van de op zichzelf reeds voor de hand liggende voorstelling, dat de verdere ons heden ten dage bekende bacteriënvormen zich geleidelijk uit dezen eenvoudigsten oervorm hebben ontwikkeld. En wel bestaat er aanleiding om aan te nemen, dat deze evolutie zich in eenige onderling onafhankelijke richtingen zal hebben voltrokken, op de wijze als in onderstaand diagram is aangegeven.



Naast de physiologische evolutie, waarvan ik zooeven althans enkele der groote lijnen onder Uw aandacht bracht, zou zich dus een morphologische evolutie hebben voltrokken en de hedendaagsche bacteriënwelt met haar zoo uiteenlopende vormen en dito stofwisselingseischen zou de resultante van deze twee categorieën van ontwikkelingsprocessen zijn.

Indien deze zienswijze juist is, bestaat er uiteraard alle aanleiding om haar tot basis te nemen van de hedendaagsche bacteriënsystematiek en een eerste poging om dit beginsel door te voeren is dan ook neergelegd in een spoedig verschijnende publicatie van mijn collega *van Niel* en mijzelf. Hoezeer ook wordt erkend, dat een consequente doorvoering van het opgestelde beginsel in speciale onderdeelen der bacteriologie nog op groote moeilijkheden stuit, toch ziet het er naar uit, dat langs dezen weg althans een eerste natuurlijke ordening van de groote groep der *Eubacteriales* is te verkrijgen.¹⁰⁾

Hiermede ben ik dan geleidelijk genaderd tot de *microben-*

¹⁰⁾ A. J. Kluyver und C. B. van Niel, Zentralbl. f. Bakt. II, 94, 369, 1936.

wereld van het heden. Het behoeft geen toelichting, dat het niet mijn doel kan zijn er naar te streven U een overzicht te geven van de verscheidenheid, waarin deze wereld zich heden ten dage aan ons openbaart. Slechts wil ik zeer beknopt met U de vraag bespreken, hoever onze kennis van deze wereld in haar huidige gedaante reikt, waarbij ik mij wederom tot enkele oppervlakkige opmerkingen zal moeten beperken.

In een omgeving als deze is het overbodig er aan te herinneren, dat nog slechts ruim 250 jaren zijn verlopen sedert de microbenwereld voor het menselijk oog werd ontsloten door den onverzadigbaren wetensdrang en de onovertroffen experimenteele vaardigheid van den man, wiens naam aan het orgaan onzer vereeniging is verbonden. En wanneer wij ons tot de bacteriën beperken, dan moeten wij constateeren, dat het nauwelijks drie kwart eeuw geleden is, dat *Pasteur* de eerste meer systematische studiën inleidde.

Op het eerste gezicht lijkt dit slechts een luttele spanne tijds voor het verrichten eener exploratie van een voor het ongewapende oog onzichtbare levende wereld, welke op aarde zulk een nagenoeg onbeperkte verscheidenheid van bestaansvoorwaarden vindt. Moeten wij hieruit niet besluiten, dat nog slechts een fractie van het microbenrijk ons is geopenbaard en dat de eerstvolgende tientallen van jaren ons nog ongedachte vormen met zelfs nooit gedroomde potenties zullen doen kennen?

En toch.... althans wat het bacteriënrijk betreft, bestaat er naar mijne meening reden voor gerechten twijfel aan de juistheid dezer zienswijze. Wanneer wij namelijk de belangrijkste ons thans bekende natuurlijke bacteriëngroepen overzien, dan treft het, dat aan hare ontdekking verbonden zijn de namen van *Ehrenberg, Pasteur, Koch, Cohn, Winogradsky* en *Beijerinck*, wat inhoudt, dat al deze vondsten reeds een halve tot een kwart eeuw achter ons liggen. Is het te gewaagd de stelling te verdedigen, dat in de laatste kwart eeuw geen nieuwe bacteriënvormen meer aan het licht zijn gebracht? In deze absolute formuleering is de opgeworpen stelling zeker voor bestrijding vatbaar, maar anderzijds, hoe poover is in laatstgenoemde periode de oogst niet geweest, vergeleken met het eerder verworvene! En dit, terwijl toch het aantal der „microbenjagers” juist in onze eeuw zulk een ongedachte uitbreiding heeft ondergaan. Is het verder niet kenschetsend, dat, ondanks de ge-

weldige opbloei der bacteriologische wetenschap in de „nieuwe wereld”, deze ontwikkeling allerminst heeft geleid tot de ontdekking eener „nieuwe microbenwereld”? Men zal mij tegenwerpen, dat het aantal der nieuw beschreven bacteriënsoorten toch dagelijks aanzwelt in een mate, welke menig onzer nachtmerries bezorgt. Intusschen, hoeveel dezer soorten mogen inderdaad op de aanduiding „nieuw” aanspraak maken; hoe talrijk zijn niet de organismen, waarvan wij dadelijk met groote waarschijnlijkheid mogen besluiten, dat zij, ook al moge zekere identificatie onmogelijk zijn, nochtans aan de aandacht van onze groote voorgangers, de explorateurs der bacteriënwereld, geenszins zijn ontgaan! Maar boven alles, waar zijn onder deze nieuw ontdekte bacteriënsoorten degene, welke, hetzij door hun primaire morphologische, hetzij door hun primaire physiologische eigenschappen, zich niet onmiddellijk aansluiten bij reeds lang en goed bekende vormen, waarvan zij dan doorgaans slechts in secundaire, dikwijls moeilijk vaststelbare, kenmerken verschillen?

Wanneer men dit alles overweegt, dan lijkt de tijd niet ver, dat de ontdekking eener werkelijk nieuwe bacteriënsoort, d.w.z. van den vertegenwoordiger eener nieuwe natuurlijke bacteriëngroep, bij de bacteriologen dezelfde sensatie zal teweeg brengen als het „Loch-Ness”-monster dit onlangs bij de zoölogen dreigde te doen.

Wellicht zult gij U afvragen, of dergelijke uitspraken niet te somber zijn getint en dus op een feestdag als deze niet misplaatst zijn. Men zou hieraan toch de conclusie kunnen verbinden, dat onze wetenschap geen ontwikkelingsmogelijkheden meer biedt en ons beroep geleidelijk aan overbodig zou worden. Het spreekt wel vanzelf, dat deze gedachten mij verre liggen. Met het voorafgaande heb ik slechts willen uitspreken, dat, bezien van het algemeen biologisch standpunt, de exploratie der bacteriënwereld reeds vrij grondig is geschied. Maar geenszins zou ik den indruk willen wekken, of de genoemde secundaire kenmerken, waarin de nieuw bestudeerde vormen van de reeds bekende afwijken, te allen tijde van weinig belang zouden zijn. Integendeel, naarmate de bacteriologische wetenschap verder is voortgeschreden, is steeds duidelijker aan het licht getreden, dat dergelijke, somtijds moeilijk na te speuren verschillen van doorslaggevende beteekenis zijn, wanneer het er op aan komt

de potentieele activiteiten der betreffende microben te beoordeelen. Als voorbeeld moge hier slechts worden genoemd de subtiële en toch in hare practische consequenties zoo uiterst gewichtige differentiatie tusschen *Vibrio cholerae* en *Vibrio El Tor*, tot de oplossing van welk vraagstuk ons medelid van *Loghem* en zijn medewerkers zulke belangrijke bijdragen hebben geleverd.

Een en ander beteekent uiteraard, dat al moge de eerste exploratie der hedendaagsche microbenwereld in groote trekken zijn volbracht, er nog een onmetelijk arbeidsveld voor ons microbiologen braak ligt voor zoover het betreft de verdieping van onze kennis der eigenschappen der kleinste levende wezens.

In de eerste plaats zal het verdere onderzoek dienstbaar moeten worden gemaakt aan een belangelooze bestudeering der algemeene levensverschijnselen, waarvoor, zooals in de laatste decennia in steeds toenemende mate is gebleken, juist de één-cellige organismen zulke groote voordeelen bieden. Ik behoef in dit verband slechts te herinneren aan het feit, dat de studie van stofwisselingsprocessen als ademhaling en photochemische koolzuurreductie in latere jaren in hoofdzaak aan micro-organismen wordt verricht. Wie Uwer denkt voorts bij de fundamentele levensvragen niet tevens aan het verschijnsel der bacteriophagie, waaromtrent in onze vergaderingen, zoowel door onzen Voorzitter als door ons medelid *den Dooren de Jong* zoo menigmaal belangwekkende mededeelingen zijn gedaan.

Anderzijds vraagt ook de verdere doorgronding van de beteekenis der microben voor de ons omringende wereld nog om een aanmerkelijke verdieping van onze kennis.

In de eerste plaats geldt dit de *geologische* beteekenis, d.w.z. de functie, welke bacteriën vervuld hebben en nog heden ten dage vervullen in den opbouw van de aardkorst. Ik herinnerde in den aanvang aan de vondsten der palaeontologen wat betreft het voorkomen van bacteriën in bepaalde aardlagen. Eerst geleidelijk begint evenwel bij de geologen het besef door te dringen, dat een massaal bacteriën-voorkomen een stille getuige is van biochemische omzettingen van zelfs geologisch belangrijke dimensies. Ik wijs hier slechts op het onderzoek van *Schneiderhöhn*¹⁾ over het ontstaan van het „Mansfelder

¹¹⁾ *H. Schneiderhöhn*, Neues Jahrb. f. Mineralogie, Geologie und Paläontologie 47 (Beil. Bd.) 1, 1923.

Kupferschiefer", dat naar alle waarschijnlijkheid zijn oorsprong dankt aan de zwavelwaterstofproductie onder den invloed van de voor het eerst door wijlen ons eerelid *Beijerinck* beschreven sulfaatreducerende bacteriën. En voorts aan de laatstelijk door *Bavendamm* ¹²⁾ bestudeerde zeer gevarieerde microbenflora, welke verantwoordelijk is voor de kalkafzettingen uit zoet en zout water, die o.m. geleid hebben tot de kalksteenformaties der Bahama-eilanden. Deze voorbeelden zouden nog met tal van andere kunnen worden aangevuld en toch lijdt het nauwelijks twijfel, dat verdere onderzoekingen zullen leeren, dat men aan de geologische beteekenis der microbenwereld nog steeds geen voldoende recht heeft doen wedervaren.

Wat de algemeen *biologische* beteekenis der microbenwereld aangaat, zijn wij er allen mede vertrouwd, dat deze een onmisbare schakel vormt in den kringloop der stof. Indien de microbenwerking zou worden uitgeschakeld, zou toch niet alleen de aarde spoedig worden bedekt met de afgestorven individuen uit de wereld der hogere organismen, doch tevens zou binnen enkele eeuwen ¹³⁾ het plantenleven en diens gevolg ook dat der dierlijke organismen, wegens gebrek aan koolzuur in de atmosfeer, onmogelijk worden gemaakt. De levende natuur moet blijkbaar met haar kapitaal woekeren en het is de microbenwereld, welke dit kapitaal liquide houdt. Geen bestanddeel der levende cel, of er is weer een andere cel, die dit bestanddeel als voedsel kan aanvaarden; de aanpassing lijkt in dit opzicht volmaakt. Heeft men zich intusschen wel eens afgevraagd, of de mensch — meer in het bijzonder de chemicus — hier niet op storende, wellicht zelfs gevaarlijke wijze ingrijpt? Zijn toch in de microbenwereld potenties verscholen, welke in staat zijn ook de producten der moderne chemische industrie, zooals de verschillende soorten kunstzijde, bakeliet en andere kunstharsen, in de mineralisatie te betrekken? Of staat ons op den duur het schrikbeeld te wachten van een aardkorst, waarin het koolstofkapitaal der aarde in verstrooide en daardoor voor den mensch practisch ontoegankelijke kunstharsafzettingen is opgeborgen? Het gevaar lijkt gezocht en is in ieder geval nog ver, maar anderzijds zou een onderzoek naar de capaciteiten der

¹²⁾ W. *Bavendamm*, Archiv f. Mikrobiol. 3, 207, 1932.

¹³⁾ Vergel.: H. *Schroeder*, Die Naturwissensch. 7, 8, 1919.

microbenwereld in dit opzicht zeker niet zonder bekoring zijn.

Tot op zekere hoogte hieraan tegengesteld is het vraagstuk om onze kennis der microbenwereld, in sterkere mate dan thans reeds geschiedt, dienstbaar te maken aan het proces der *maatschappelijke voortbrenging*. Wie onzer is niet getroffen door de vergankelijkheid van voedingsstoffen en van voor andere doeleinden gebruikte organische materialen en wie onzer realiseert niet, dat deze vergankelijkheid in den regel een rechtstreeksch uitvloeisel is van het feit, dat de microbenwereld haar natuurlijke rechten doet gelden? Hieraan paal en perk te stellen, m.a.w. conserveerend op te treden, is voorwaar een schoone taak voor het toegepast microbiologisch onderzoek. Voor zoover het hierbij om andere objecten dan voedingsmiddelen gaat, b.v. om constructiematerialen als hout, weefsels (zeildoek e.d.), lijkt het evenwel twijfelachtig of men reeds voldoende aandacht heeft geschonken aan de zoeven gememoreerde waarschijnlijkheid, dat de chemicus het in zijn macht heeft een organische wereld te scheppen, waarop de levende natuur geen antwoord klaar heeft!

Hiertegenover staat dan weer het streven om de biochemische activiteiten der microbenwereld rechtstreeks aan het voortbrengingsproces dienstbaar te maken. De kwart eeuw van het bestaan onzer vereeniging bracht de industrieele bereiding van producten als butylalcohol, aceton, butyleenglycol, diacetyl, citroenzuur en gluconzuur, gebaseerd op de toepassing van rationeel geleide microbenstofwisselingsprocessen. Zou hiermede in dit opzicht het laatste woord zijn gesproken? Het is nauwelijks denkbaar en ten tijde van het gouden vereenigingsjubileum zal aan dit lijstje nog wel menig product zijn toegevoegd.

Een uitgebreid arbeidsveld is voorts zeker nog te vinden in een diepergaande studie van de beteekenis der microben voor de *pathologie* van plant en dier. Weliswaar krijgt men den indruk, dat de toegepaste microbiologie misschien nergens groter triomfen heeft gevierd, dan waar het de diagnostiek en de therapie der infectieziekten betrof. Maar eerst in den laatsten tijd zijn eenige vorderingen gemaakt in de richting van een beter begrip van de biologische grondslagen van het parasitisme. Het is verleidelijk dienaangaande eenige opmerkingen te maken, waarbij ik mij wil aansluiten bij uiteenzettingen, welke voor-

komen in het onlangs verschenen boek van *Zinsser*, den bekenden bacterioloog van Harvard University. Onder den lichtelijk misleidenden titel van „Rats, Lice and History”, geeft *Zinsser* in dit fascinerende boek, wat hij noemt, een „biographie” van de vlektyphus.¹⁴⁾

Zinsser geeft in den aanvang eenige algemeene beschouwingen over den oorsprong van het parasitisme, waarbij hij o.m. op den reeds vermelden hoogen ouderdom van dit verschijnsel wijst. Uiteraard beteekent parasitisme niets anders dan het verbreken van den natuurlijken weerstand, welke ieder levend systeem tegen doordringing van een tweede systeem van vreemden aard biedt. Voor zoover dit verschijnsel onmiddellijk leidt tot een afsterven van het „doorbroken” systeem blijft het van eenvoudigen aard. Het eigenlijke parasitisme ontstaat nu evenwel tengevolge van de omstandigheid, dat somtijds de indringers zich vasten voet veroveren in het lichaam van den gastheer op zoodanige wijze, dat deze daaraan niet of slechts geleidelijk te gronde gaat.

In den loop van de ontwikkelingsgeschiedenis van het leven op aarde heeft dit verschijnsel zich ongetwijfeld in talrijke gevallen voorgedaan en er is alle reden om aan te nemen, dat op dit gebied zich nog bij voortduring nieuwe „incidenten” voordoen.

Deze incidenteele theorie van het ontstaan van het parasitisme wordt nu in hoofdzaak gesteund door het feit, dat al mogen laboratoriumproefnemingen tot rechtstreeksche verandering van saprophyten in parasieten tot dusver geen zekere uitkomsten hebben opgeleverd, men nochtans vrijwel geen parasiet ontmoet, die niet onmiskenbare verwantschap vertoont met bepaalde vrij levende vormen. Voorts hebben recente onderzoekingen over dissociatieverschijnselen bij pathogene kiemen geleerd, hoe hieruit onder den invloed van bepaalde uitwendige omstandigheden avirulente vormen ontstaan, welke intusschen onder andere voorwaarden hun virulentie weer kunnen herwinnen.

Kenmerkend voor het leven van den indringer in den gastheer is nu buiten twijfel de wederzijdsche aanpassing. Talrijk zijn heden ten dage de bewijzen, dat de parasitaire leefwijze

¹⁴⁾ *H. Zinsser*, Rats, Lice and History. London, 1935.

leidt tot veranderingen in eigenschappen, welke eenerzijds in bepaalde gevallen zich uiten in een vrijwel volledig verlies van het vermogen tot voortbestaan in de vrije natuur en anderzijds in afwijkende reacties bij droordringen in andersoortige gastheeren. Het o.m. door onzen oud-voorzitter *Schüffner* zoo diepgaand bestudeerde virus van de gele koorts verandert bij enting in muizen van aard, waarbij het een bepaalden vorm van encephalitis verwekt; van daar teruggebracht op apen handhaaft het zijn neurotroop karakter.

Het zal duidelijk zijn, dat de grootste adaptatieve veranderingen daar zullen optreden, waar de parasiet zijn vermogen tot zelfstandig leven verliest, doch zich weet te handhaven door regelmatig overgaan van het eene individu van den gastheer op het andere. Soms bereikt de wederzijdsche aanpassing dan een dergelijken graad van volmaaktheid, dat de gastheer geenerlei symptomen van hinder vertoont. Bij de hogere dieren vindt men dit verschijnsel b.v. bij de spirochaetose der muizen, bij lagere dieren, in het bijzonder bij insecten, leidt dit tot de uiterst veelvuldig voorkomende „endosymbiose” met zeer verschillende micro-organismen.¹⁵⁾

De aanwijzingen beginnen zich nu te vermeerderen, dat vele der parasieten, welke den mensch en in het algemeen hogere dieren en ook planten belagen, juist te vinden zijn onder die microben, welke in lagere organismen een adaptatieve leerschool hebben doorgemaakt. Terwijl zij in deze laatste organismen zich tegenover de aanwezige natuurlijke weerstanden veelal slechts in die mate verzetten, dat het tot de handhaving van een evenwichtstoestand komt, doen zij dit blijkbaar met strijdmiddelen, waartegen andersoortige, niet aangepaste gastheeren niet bestand blijken te zijn.

Voor bepaalde vormen van vlektyphus is het thans wel zeer aannemelijk geworden, dat hieraan primair ten grondslag ligt een infectie van de rattenvloo met den daarin somtijds aan te treffen *Rickettsia*-parasiet, welke, hetzij direct, hetzij via de nieuwe infectie van rat en rattenvloo, op den mensch kan worden overgedragen, waarna dan voorts de menschelijke luis de taak van de verspreiding onder de menschheid kan overnemen.

¹⁵⁾ Vergel.: *P. Buchner*, Tier und Pflanze in Symbiose, 2te Aufl. Berlin 1930; *W. Schwartz*, Archiv f. Mikrobiol. 6, 369, 1935.

In dit geval is de invasie van zoowel de rattenvloot als de menschelijke luis door de *Rickettsiae* blijkbaar nog van vrij recenten datum, in zooverre, dat volledige aanpassing nog niet tot stand is gekomen; beide overdragende insecten plegen aan de infectie te succumbeeren. In het geval van de „Rocky Mountain fever” daarentegen is de *Rickettsia*-infectie van de teken reeds veel verder in de aanpassing voortgeschreden, deze wordt hier regelmatig van generatie op generatie overgedragen, oogenschijnlijk zonder hinder voor het insect.

Met dergelijke voorbeelden voor oogen lijkt het wel heel waarschijnlijk, dat nog vele ziekten, in het bijzonder virus-ziekten van dier en plant zich in verband zullen laten brengen met één der honderden gevallen van endosymbiose bij lagere dieren, welke in latere jaren vóór alles door het werk van *Buchner* en zijn school aan het licht zijn gekomen, doch welke tot dusver nog slechts onvolledig zijn bestudeerd. Een studie van de adaptatieve veranderingen der parasieten bij overdracht in uiteenlopende gastheeren schijnt in dit verband nog wel zeer veelbelovend.

Tenslotte zou ik U zeker tekort doen, indien ik in aansluiting op *Zinsser's* „vlektyphus-biographie” niet ook even stilstond bij zijn zoo belangwekkende beschouwingen over den invloed van de microbenwereld op het aanzien van onze *menschelijke samenleving*. *Zinsser* brengt in zijn boek een hoogst merkwaardige documentatie ten gunste van de zienswijze, dat onze geschiedenisboeken ons ten onrechte doen gelooven, dat het lot van vorsten, naties en volken veelal op het slagveld door den heldenmoed der legerscharen is beslist. *Zinsser* geeft talrijke voorbeelden, waaruit wij veeleer moeten besluiten, dat het de held van zijn biographie, de vlektyphus, en zijn naaste verwanten zijn geweest, die geholpen door hun trawanten: rat en luis, den loop der historie hebben bepaald. Enkele voorbeelden mogen hier worden vermeld. De inval der Perzen in Griekenland onder Xerxes werd ongetwijfeld door infectieuze ziekten, waarbij deze koning bijna de helft van zijn 800.000 man sterke leger verloor, tot een débacle. De geschiedenis der Kruistochten is in werkelijkheid vóór alles een kroniek van infectieziekten, waarbij zich dan ook nog scheurbuik voegde. De dertigjarige oorlog, de binnenlandsche onlusten in Engeland ten tijde van Karel I, Napoleon's tocht naar Rusland, zij alle werden beslist

door de ongelijke mate, waarin de vlektyphus en enkele microben-bondgenooten zich met de strijdende kampen occupeerden.

In den Krim-oorlog leden beide partijen in nagenoeg gelijke mate; toch is deze in het beschouwde verband leerrijk, omdat het de eerste groote oorlog was, waarbij min of meer betrouwbare statistieken aangaande den omvang der ziekten werden bijgehouden, terwijl anderzijds de preventieve geneeskundige actie te dien tijde nog te onbeteekenend was om veel invloed op den gang van zaken te hebben. Het door *Zinsser* gegeven, aan *von Linstow* ontleende, tabelletje, laat geen twijfel aangaande het feit, dat niet de bloedige gevechten, doch veeleer de epidemieën van vlektyphus en cholera de grootste afbreuk deden aan de strijdkrachten van de oorlogvoerende mogendheden.

Doorgaans wordt te weinig gerealiseerd, dat ook in den wereldoorlog een groot deel der geleden ellende rechtstreeks aan den vlektyphus moet worden geweten. Reeds einde 1914 stak deze het hoofd op in Servië en verspreidde zich van daar over het geheele Oostfront; in het eerstvolgende halve jaar stierven alleen in Servië reeds 150.000 personen aan de ziekte, terwijl het aantal ziektegevallen in Rusland in de jaren 1917 tot 1921 waarschijnlijk 25.000.000 bedroeg, waarvan ongeveer 3.000.000 met doodelijken afloop. Dat het Westfront van vlektyphus verschoond bleef, is een der opmerkelijkste feiten van den oorlog en kan slechts worden geweten aan de effectieve maatregelen der geneeskundige organisaties der strijdende legerkrachten. In het bijzonder geldt dit voor den Duitschen dienst, daar door het geregeld vervoer van troepen van het Oosten naar het Westen bij voortduring dreigend gevaar voor binnensleepen van vlektyphus bestond. Zooals *Zinsser* in dit verband opmerkt, moet de mortaliteit der luizen in den oorlog de grootste zijn geweest, welke ooit in de wereldgeschiedenis is opgetreden.

Kan het verwonderen, dat *Zinsser* met feiten als deze voor oogen een hoofdstuk wijdt aan „the relative unimportance of generals” en den tijd ziet aankomen, dat in zake den aard der te ondernemen krijgsverrichtingen de beslissing zal liggen in de hand van den leider van den militairen gezondheidsdienst?

Het voorafgaande, min of meer op den „Cineac” geïnspireerde overzicht moge voldoende zijn geweest om U enkele der belangrijkste aspecten van de hedendaagsche microbenwereld voor oogen te roepen en U er van te doordringen, dat er wat betreft ons inzicht in de beteekenis dier wereld nog tallooze vraagstukken op bewerking wachten.

De vraag rijst dan evenwel, of deze van zuiver wetenschappelijk standpunt uiteraard reeds oneindige taak toch wellicht in één opzicht begrensd is, namelijk in zooverre, dat de microbioloog ook in de toekomst slechts rekening zal hebben te houden met de microbenwereld, zooals die heden ten dage bestaat. Of moeten wij, zooals de titel van mijn voordracht min of meer suggereert, besluiten, dat er sprake kan zijn van een *toekomstige* microbenwereld, welke van de hedendaagsche verschilt?

Ziehier een vraag, waarvan de beantwoording den spreker voor groote moeilijkheden stelt. Men kan zelfs zeggen, dat zij van dezen ziensskwaliteiten eischt, waarvan het gemis door mij maar al te goed wordt beseft. Ik zal daarom in dit verband slechts eenige schuchtere opmerkingen kunnen maken.

Bezieet men het vraagstuk van het ruime standpunt eener evolutieleer, dan lijkt het nauwelijks aan twijfel onderhevig, dat indien onze aarde er in zou slagen haren leeftijd nog te verdubbelen, de 350.000.000 jaren, welke dan nog voor ons liggen, ook in de wereld der ééncelligen nog een belangrijke ontwikkeling tot stand zullen brengen. Kunnen wij ons een voorstelling maken, welke richting deze zal nemen?

Het antwoord kan slechts zuiver speculatief zijn, maar wellicht kunnen wij daarvoor in een bepaalde merkwaardige microbengroep een zekere aanwijzing vinden. Ik denk hier aan de, in de eerste plaats door *Thaxter* bestudeerde, natuurlijke groep der *Myxobacteriaceae*, waarvan de enkele cel ons het beeld van een normale staafvormige bacterie toont, maar welke organismen gekenmerkt zijn door de eigenschap, dat de afzonderlijke ééncellige individuen zich samenvoegen tot associaties, welke door min of meer constante gedaanten zijn gekarakteriseerd. Hier hebben we dus de opmerkelijke combinatie van de ééncellige bestaansmogelijkheid en van de ontwikkelingsphase, waarin het individu zich ondergeschikt maakt aan de

voor iedere soort karakteristiek gevormde gemeenschap.¹⁶⁾

Aan deze feiten wordt uiteraard geen afbreuk gedaan door de omstandigheid, dat de systematische positie der *Myxobacteriaceae* en in het bijzonder hun verwantschap tot de *Eubacteriales* nog steeds een veel omstreden vraagstuk vormt.

Wellicht evenwel zijn soortgelijke tendenties ook reeds terug te vinden in andere groepen van het bacteriënrijk. Tot dergelijke gedachten wordt men gebracht, wanneer men kennis neemt van de belangwekkende uitkomsten van de onderzoekingen van *Legroux* en *Magrou*¹⁷⁾ over den bouw der koloniën van vele onzer gewoonste bacteriënsoorten. De meesten onzer zijn geneigd om koloniën te beschouwen als ophooping van gelijkwaardige bacteriënindividuen. De door genoemde onderzoekers gegeven afbeeldingen van doorsneden van koloniën van *Vibrio cholerae* geven evenwel een dermate treffende differentiatie en ordening te zien, dat de vraag rijst, of ook hier niet het individu tot op zekere hoogte in een gemeenschap is opgelost. Indien hier inderdaad zou kunnen worden gesproken van staatsvormende neigingen bij ééncelligen, zooals wij die bij hogere organismen als bijen, mieren e.d. hebben leeren kennen, dan lijkt het niet te gewaagd te besluiten, dat dergelijke statengemeenschappen nog vele evolutionnaire mogelijkheden in zich zullen sluiten. Ook hier zouden monarchistische en communistische, rechtsstaten en machtsstaten elkaar kunnen opvolgen en de bacterioloog van 100.000.000 jaren later zal wellicht over de pen van een *Maeterlinck* moeten beschikken om een aan diens „La vie des abeilles” gelijkwaardig „La vie des bactéries” te kunnen schrijven.

Maar keeren wij van deze fantasieën aangaande situaties in zoo ver van ons verwijderde tijdperken terug naar een althans ietwat nuchterder beschouwing eener meer nabijzijnde toekomst. Dan komt dus de vraag aan de orde, of de microbioloog van over 25 of 50 jaren kans zal hebben op ontmoetingen met micro-organismen, welke gekenmerkt zijn door een op den huidige dag onbekend, of juist gezegd zelfs niet bestaand, eigenschappencomplex. Het zal duidelijk zijn, dat het antwoord op

¹⁶⁾ Vergel. bijv.: A. Quehl, Zentralbl. f. Bakt. II, 16, 9, 1906 en C. Vahle, Zentralbl. f. Bakt. II, 25, 178, 1909.

¹⁷⁾ R. Legroux et J. Magrou, Ann. Inst. Pasteur 34, 417, 1920.

deze vraag beheerscht wordt door onze inzichten in zake de veranderlijkheid der microben.

Het behoeft in dezen kring geen toelichting, dat het optreden van veranderingen bij de meest uiteenlopende microbensoorten een verschijnsel is, dat zich helaas maar in al te sterke mate doet gevoelen. Door *van Loghem*¹⁸⁾ zijn nu in later jaren belangwekkende beschouwingen gepubliceerd, welke beoogen een indeeling van deze in wezen uiteenlopende verschijnselen te geven. De gelegenheid ontbreekt thans hierop dieper in te gaan. Er moge mee worden volstaan, er op te wijzen, dat *van Loghem* het optreden van ware mutaties, d.w.z. van veranderingen in genotypische constitutie, bij microben weliswaar zeldzaam acht, doch dat hij deze anderzijds niet geheel wenscht uit te sluiten. Naar aanleiding van de ervaringen bij hogere organismen opgedaan, bestaat er dan ook wellichtaanleiding om de door *Nadson* en medewerkers¹⁹⁾ bij inwerking van Röntgen-stralen en radium-emanatie waargenomen veranderingen in gist- en schimmelsoorten als dergelijke ware veranderingen van het genotype te beschouwen. In de natuur zouden wellicht cosmische stralen een overeenkomstig effect kunnen bewerken. Mutatie zou dus reeds dadelijk één bron kunnen zijn, waardoor de microbenwereld der toekomst met nieuwe soorten wordt verrijkt.

Voor het overige geeft *van Loghem* argumenten ten gunste van de zienswijze, dat men in den regel met niet-erfelijke veranderingen te doen heeft, welke intusschen ten deele wel een blijvend karakter zouden kunnen hebben. Dit laatste zou echter alleen voorkomen bij regressieve veranderingen, welke in feite het karakter van een beschadiging zouden dragen. Dit zou dus beteekenen, dat verdere blijvende verrijking der microbenwereld slechts met atropheonten, mutilaten en degeneranten zou kunnen plaats hebben, hetgeen voorwaar geen opwekkend vooruitzicht is!

Zonder hier de juistheid der gegeven indeeling in het geding te willen brengen, lijkt intusschen de vraag gewettigd, of

¹⁸⁾ J. J. van Loghem, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 65, 2981, 1921; Ibid. 73, 655, 1929; Ibid. 74, 4402, 1930; Proc. Kon. Akad. v. Wet. 34, 309, 1931.

¹⁹⁾ G. Nadson et G. Philippov, C. R. Acad. Sc. 186, 1566, 1928; C. R. Acad. Sc. de l'URSS, 1931, p. 1.; Ibid. 1931, p. 34; Ibid. 1931, p. 39; Ibid. 1931, p. 1932; Archiv f. Mikrobiol. 4, 189, 1933.

dit perspectief inderdaad zoo erg is, als het op het eerste gezicht lijkt. Het komt mij namelijk voor, dat nieuwe vormen, welke van theoretisch standpunt wellicht als atropheont moeten worden beschouwd, bij onbekendheid met hun voorgeschiedenis in vele gevallen door den bacterioloog als nieuwe gave vormen zullen worden verwelkomd. Dit moge met een enkel voorbeeld worden toegelicht.

Door Mej. Hof²⁰⁾ werd voor eenigen tijd in het Delftsche laboratorium vastgesteld, dat het mogelijk is uit normalen tuingrond een bacterie te isoleeren, welke in staat is 'zich te ontwikkelen in een bepaald voedingsmedium, waaraan 30% keukenzout was toegevoegd. Op zichzelf is dit niet zoo opmerkelijk, doch het verrassende gezichtspunt is, dat deze in reincultuur gebrachte bacterie hardnekkig weigerde in eenig medium zonder keukenzout te groeien, een minimum van 6% van dit zout bleek hiervoor onmisbaar. Daar het uitgesloten is te achten, dat ieder korreltje tuingrond van nature obligeert halophile bacteriën bevat, welke tot in lengte van dagen liggen te wachten op de practisch geheel te verwaarloozen kans, dat zij in dergelijke zoutrijke media terechtkomen, moeten wij wel besluiten, hier met een verandering van een normale bodembacterie te doen te hebben. Daar nu de waargenomen halophilie een blijvend karakter bleek te dragen — alle pogingen tot heraanpassing aan zoutvrije media bleven zonder resultaat — moeten wij in het schema van *van Loghem* de ingetreden verandering als van regressieven aard beschouwen. Wat wij een „physiologisch artefact” hebben genoemd, zou in diens terminologie, op grond van het verlies van de functie in zoutvrije media te groeien, zeker als een atropheont zijn aangeduid. Denken wij er ons nu evenwel in, dat dezelfde verandering, welke ditmaal zich in het laboratorium voltrok, zich zou afspelen in de vrije natuur. Een grondstofje komt door den wind terecht in een zoutmeer, vindt daar ook overigens gunstige ontwikkelingsvoorwaarden, welke tot biochemische omzettingen leiden op een dergelijke schaal dat zij den kringloop der stof in het meer beïnvloeden. Een eeuw later komt de microbioloog, hij isoleert de bacterie, ontdekt hare beteekenis voor de huishouding van het meer en stelt hare gebondenheid aan het zoutrijke medium vast. Het is niet aan

²⁰⁾ T. Hof, Recueil d. Trav. Bot. Néerl. 32, 92, 1935.

twijfel onderhevig of de bacterie zal als een nieuwe belangwekkende soort worden beschreven en terecht!

Nog een ander voorbeeld aan recente ervaring ontleend, moge worden gegeven. Van tijd tot tijd duiken in de bacteriologische literatuur berichten op over „tibi”, een merkwaardige microben-associação, welke oorspronkelijk op de bladschijven van *Opuntia's* in Mexico zou zijn aangetroffen. Het door den heer *Mayer* in mijn laboratorium verrichte onderzoek bevestigde de uitkomsten van vroegere onderzoekers als *Blumer* ²¹⁾, *Porchet* ²²⁾ e.a., n.l., dat men hier te doen heeft met een symbiose van een gistsoort en een staafvormige melkzuurbacterie, vermoedelijk dezelfde bacterie, welke reeds ruim 40 jaren geleden door *Ward* ²³⁾ als *B. vermiforme* is beschreven. *Mayer* vond nu, dat deze bacterie, beter als *Betabacterium vermiforme* aan te duiden, een karakteristieke dissociatie vertoonde, welke zich bij cultiveering op glucosehoudende voedingsmedia als een typische „rough”-„smooth” variatie der koloniën verraaft. Bij het verdere onderzoek bleek nu, dat de „rough”-vorm mede gekenmerkt was door haar neiging tot vroegtijdig afsterven, iets wat o.a. door *Botman* ²⁴⁾ als karakteristiek voor „rough” vormen in het algemeen wordt aangegeven. Men komt er dan toe deze „rough”-vorm als degenerant te beschouwen. Anderzijds bleek nu evenwel, bij het verdere onderzoek, dat alleen de „rough”-vorm op rietsuikerhoudende media aanleiding kan geven tot den typischen harden kapselvorm, welke beslissend is voor de kraakbeenachtige, elastische constitutie van de associatie met de gist: de tibi. De „smooth”-vorm daarentegen geeft zelfs geenerlei aanleiding tot vorming van dextran.

Hier zouden wij dan andermaal een voorbeeld hebben van een regressiven vorm, welke in de natuur een zelfstandig en karakteristiek bestaan leidt.

Hieraan zij nog slechts het volgende toegevoegd. Ook al zouden wij met *van Loghem* moeten besluiten, dat adaptatieve veranderingen te allen tijde onstandvastig zouden blijven, noch-

²¹⁾ *S. Blumer*, Zentralbl. f. Bakt. II, 91, 39, 1934.

²²⁾ *B. Porchet*, Mitt. Lebensmittellunters. und Hygiene v. Eidg. Gesundheitsamt 25, 237, 1934.

²³⁾ *M. Ward*, Phil. Trans. Royal Soc. London 183, 126, 1892.

²⁴⁾ *Th. P. J. Botman*, Onderzoekingen over de veranderlijkheid van vibrionen, mede in verband met het El Tor-vraagstuk. Diss. A'dam, 1936.

tans zijn de verkregen adaptaten er niet minder reëel door. En zooals eerder opgemerkt, laat het zich aanzien, dat de adaptatieve leerschool, welke nieuwe parasieten in het inwendige van hun gastheer doorloopen, aanleiding zal kunnen geven tot het ontstaan van het vermogen om weer andersoortige gastheeren te invaheeren. Dergelijke adaptaten zullen steeds een bron vormen voor de tot stand koming van nieuwe infectieziekten voor mensch, dier en plant. *Zinsser* acht het mogelijk, dat wij in *Tularaemia* een voorbeeld hebben van een dergelijke nieuwe infectieziekte, welke eerst in de 20ste eeuw is opgetreden. In het bijzonder zal het dus den microbioloog-patholoog zeker niet aan noviteiten ontbreken; tot troost van de lijdende menschheid zij hiertegenover er op gewezen, dat oogenschijnlijk verschillende uit de geschiedenis bekende infectieziekten heden ten dage geheel zijn verdwenen.

Op grond van al het voorafgaande lijkt de conclusie gewettigd, dat ook de microbioloog van het jaar 2000 zijn „sensaties” zal hebben. Hij moge dan geen nieuwe natuurlijke microbengroepen ontdekken, wel intusschen zal hij binnen één bepaalde groep vormen ontmoeten met onbekende eigenschappen-complexen, waaruit nieuwe, ongekende potenties zullen voortspuiten.

Tot besluit alleen nog dit. De naam microbiologie en de eere-titel van microbioloog worden niet zelden in bepaalde kringen op denigreerende wijze geïnterpreteerd. Men verbindt daaraan dan stilzwijgend de beteekenis van een biologie, respectievelijk van een bioloog van klein formaat. De gegeven uiteenzettingen mogen er toe hebben bijgedragen, op dit feestelijk oogenblik het besef te verlevendigen, dat de problemen van den logos der microbia de vergelijking met die der zusterwetenschappen glansrijk kunnen doorstaan.

Maar afgescheiden van alle voor de menschheid belangrijke toepassingen onzer wetenschap mogen wij te allen tijde ontvankelijk blijven voor de gedachte, die de groote microbioloog *Christian Gottfried Ehrenberg* nu juist bijna een eeuw geleden vertolkte, toen hij in de opdracht van zijn levenswerk schreef:

„Es gibt ein vollendetes organisches Leben im unsichtbar kleinen Raume, welches die Grösse des Grossen in der Natur unabsehbar erhebt.”

Stofwisselingsproeven met *C. Diphtheriae* I.¹⁾

DOOR

Dr. A. TASMAN en Dr. A. C. BRANDWIJK.

De bereiding van diphtherietoxine op groote schaal is, ondanks de vele onderzoekingen, die op dit gebied verricht zijn, nog steeds een zeer wisselvallig bedrijf. Soms gelukt het om maanden achtereen met een bepaalden voedingsbodem goede resultaten te bereiken, terwijl dan vaak plotseling, zonder dat men de reden hiervan kan opsporen, de resultaten zeer onbevredigend worden. Ongetwijfeld is de oorzaak van deze mislukkingen voor een meer of minder groot gedeelte te zoeken in het feit, dat de meest gebruikelijke voedingsbodems van zeer samengestelden aard zijn en naast eenvoudige verbindingen als suikers, anorganische zouten, enz. steeds vleeschextract en de een of andere peptonsoort bevatten.

De meeste onderzoekers, welke trachtten een dieper inzicht in dit probleem te verkrijgen, gebruikten dan ook voor hun proeven voedingsbodems van eenvoudiger samenstelling, zich wel realiseerende, dat het alleen op deze wijze mogelijk zou zijn een beteren indruk van de afzonderlijke factoren, de toxinevorming betreffende, te verkrijgen.

De onderzoekingen op het gebied der diphtheriestofwisseling zijn in hoofdzaak in twee groepen te verdeelen, n.l. die der *assimilatorische*- en die der *dissimilatorische* stofwisseling. Wat de eerste betreft, stelde men zich ten doel na te gaan, welke de minimumeischen van de diphtheriebacteriën zijn, opdat een meer of minder duidelijke groei waargenomen kan worden, m.a.w. welke verbindingen voor den opbouw van de cel noodzakelijk zijn. Van de hierop betrekking hebbende onderzoekingen mogen o.a. genoemd worden die van *Braun*¹⁾, *Braun* en *Hof-*

¹⁾ Voordracht gehouden voor de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie op 23 Mei 1936.

meier²⁾, Braun en Mündel³⁾, Braun, Hofmeier en Mündel⁴⁾, Nitsch⁵ en Mueller⁶⁾.

Wat de onderzoekingen over de dissimilatorische stofwisseling betreft, kan slechts op enkele publicaties gewezen worden en wel op die van Mej. de Wolff⁷⁾ en A. en G. Hottinger⁸⁾. Deze laatste onderzoekers trachtten na te gaan, hoe de concentratie van verschillende stoffen (totaal-stikstof, rest-stikstof, aminozuren, cystine, CO₂) gedurende den groei en de toxinevorming veranderden. Fujita en Kodama⁹⁾ beschrijven een onderzoek over de „Atmung und Gärung von *C. Diphtheriae*”, waarin de ademing en het zuurstofverbruik van diphtheriebacteriën onder verschillende omstandigheden nagegaan werden. Op ditzelfde gebied is ook nog een onderzoek van Ehrismann¹⁰⁾ verschenen, dat speciaal de aandacht vestigt op de nitraatreductie, welke onder passende omstandigheden op kan treden.

Opvallend is echter het feit, dat bij al deze experimenten aan de toxinevorming als zoodanig weinig of geen aandacht geschonken is. Slechts enkele onderzoekers maken hiervan melding, doch de gevormde hoeveelheden toxine zijn meestal zóó gering, dat hieraan voor een practische toepassing geenerlei waarde toegekend kan worden.

Naast de genoemde onderzoekingen is in de oudere, zoowel als in de nieuwere literatuur een haast ontelbaar aantal mededeelingen te vinden, waarin verschillende „routine”-voedingsbodems beschreven worden, respectievelijk de aandacht gevestigd wordt op sommige voor de toxinevorming belangrijke factoren. De oudere literatuur vindt men voortreffelijk samengevat en met eigen experimenten aangevuld in de monografie „Diphtheria” van de Medical Research Council¹¹⁾. Na een uitvoerige bespreking van alle op dat moment beschikbare gegevens, komen de schrijvers tot de conclusie: „At the moment it is only by adhering rigidly to certain formulae of technique that one may hope to arrive at a satisfactory product, and even with the most careful work and attention to detail, some batches of toxin do not come up to the standard of potency demanded by the maker of antitoxin. Certain factors are still beyond control, and until these are elucidated, the problem of making toxin on an entirely satisfactory basis will not be solved.”

Ondanks de zeer groote hoeveelheid werk, die na 1923 op

dit gebied verricht is, moet o.i. de boven aangehaalde uitspraak onverzwakt gehandhaafd worden. Van de recentere literatuur willen wij slechts enkele publicaties nader beschouwen.

Tomcsik ¹²⁾ neutraliseerde een bij de bereiding te alcalisch geworden bouillon met azijnzuur en constateerde een aanzienlijk verbeterde toxinevorming. Terecht concludeerde hij uit deze waarneming, dat het aldus gevormde acetaat een zeer gunstige factor voor de toxinevorming zou zijn en voegde daarom steeds aan al zijn voedingsbodems 0,5 % natriumacetaat toe. Sindsdien wordt een dergelijke hoeveelheid natriumacetaat in bijna alle voorschriften aangetroffen. *Wadsworth* en *Wheeler* ¹³⁾ gebruikten een zeer eenvoudigen voedingsbodem zonder vleesch-extract en wezen speciaal op de noodzakelijkheid van het aanwezig zijn van calcium in den bouillon. Een zeer uitvoerige studie over de toxinevorming werd en wordt door *Pope* ¹⁴⁾ verricht. Hij ging uit van een z.g. „semisynthetisch” medium, waarin naast enkele anorganische zouten Difco-proteose pepton als stikstofbron gebruikt werd. Op de samenstelling en de bereiding van dezen voedingsbodem zal later teruggekomen worden. Aan een betrekkelijk eenvoudige „stamoplossing” werden verschillende koolstofbronnen, zooals suikers, organische zuren, enz. toegevoegd en de invloed van deze toevoegingen op de toxinevorming nagegaan. Doordat echter steeds meer dan één koolstofbron (b.v. azijnzuur + glucose, azijnzuur + glucose en maltose, enz.) toegevoegd werd, zijn de verkregen resultaten weinig doorzichtig. Tenslotte verdient nog een publicatie van *Ström* ¹⁵⁾ vermeld te worden. Deze onderzoeker onderzocht den invloed van verschillende stoffen, welke aan een eenvoudige stamoplossing toegevoegd werden op het beloop van de pH en de toxineproductie na de enting met een diphtherie-cultuur. Hiervoor werden verschillende suikers, alcoholen, aldehyden, zuren, enz. gekozen. Verder werd eenige aandacht geschonken aan speciale groeifactoren, welke in extracten van gist, tomaten, peren, enz. aanwezig zijn. Merkwaardigerwijze bleken deze stimuleerende factoren bestand te zijn tegen verhitting, respectievelijk verassing van genoemde extracten, zoodat hun werking zeer waarschijnlijk neerkomt op de aanwezigheid van bepaalde minerale bestanddeelen in deze vloeistoffen.

Vatten we de boven zeer in het kort weergegeven onder-

zoekingen en hun resultaten samen, dan kunnen we zeggen, dat we momenteel beschikken over verschillende voorschriften voor de bereiding van diphtherietoxine, welke soms wel, soms niet goede resultaten opleveren. Verder is dank zij deze onderzoekingen op enkele punten meer in het bijzonder de aandacht gevestigd. Doch we zijn nog zeer ver verwijderd van het ideaal van een eenvoudigen voedingsbodem, welke goed reproduceerbaar te bereiden is en derhalve veel constanter resultaten op zou kunnen leveren. Tevens ontbreekt nog ieder inzicht in het mechanisme der toxinevorming, respectievelijk van het samenstel van biochemische processen, welke uiteindelijk tot de vorming van diphtherietoxine leiden. Het hierboven aangeduide probleem is o.i. alleen op te lossen, wanneer aan de volgende voorwaarden voldaan wordt.

1. Men moet een zoo eenvoudig mogelijke „stamoplossing” gebruiken, waarvoor de door *Pope* beschreven „semi-synthetische” voedingsbodem uitstekend geschikt is.
2. Men moet trachten niet alleen een *qualitatief*, doch zooveel mogelijk ook een *quantitatief* inzicht in de zich afspelende processen te verkrijgen.
3. Men moet zijn proeven doen *in onmiddellijk verband met de toxinevorming*. Men zal dus wel een voedingsbodem van eenvoudige samenstelling kunnen kiezen, doch in deze voedingsvloei-stof moet gedurende de bebroeding na enting met een diphtheriecultuur een duidelijk aantoonbare hoeveelheid toxine gevormd worden. Proeven, waarbij geen toxine gevormd wordt, kunnen natuurlijk wel van waarde zijn als aanvulling, respectievelijk contrôle van de eerstgenoemde, doch essentieel zijn zij niet. Stofwisselingsproeven, zooals die van *Braun* en zijn medewerkers, waarbij de toxinevorming geheel of nagenoeg geheel ontbreekt, hebben o.i. voor het hierboven gestelde doel weinig of geen waarde.

Wij stellen ons nu voor, onze onderzoekingen op dit gebied als volgt in te deelen:

- 1e. Na te gaan, hoe snel de aan een eenvoudige voedingsvloei-stof toegevoegde suikers (glucose en maltose) door de diphtheriebacteriën ontleed worden en wat deze ont-

leding voor invloed uitoefent op het beloop van de pH en de toxinevorming.

- 2e. Welke de afbraakproducten zijn, die uit de suiker ontstaan en in welke hoeveelheden deze stoffen gevormd worden.
- 3e. Hoe snel de *afzonderlijke* afbraakproducten verwerkt worden en hoe deze snelheid verandert, wanneer deze stoffen in verschillende combinaties toegevoegd worden.
- 4e. Een inzicht te verkrijgen in de stikstofwisseling, resulterende uit de ontleding van de toegevoegde peptonsoort.
- 5e. Te trachten aan de hand van de in 1—4 vermelde onderzoeken te geraken tot de bereiding van een logisch samengestelden, zoo eenvoudig mogelijken voedingsbodem, welke goed reproduceerbaar is en dus waarschijnlijk veel constantere resultaten op zal leveren.

Inrichting der proeven.

Als *voedingsbodem* gebruikten we den „semi-synthetischen” bodem van *Pope*, welke de volgende samenstelling heeft:

Magnesiumsulfaat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 gram
Calciumchloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 „
Natriumphosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,0 „
Kaliumphosfaat (K_2HPO_4)	1,0 „
IJsazijn	3,0 ccm
Difco Proteosepepton	20 gram
Gedestilleerd water	1000 ccm

Na oplossen van alle bestanddeelen (zonder verwarming) wordt de pH met behulp van circa 25 %-ige natronloog op 8 gebracht en de suiker (glucose of maltose) toegevoegd. Daarna wordt door papier gefiltreerd en gesteriliseerd door middel van filtratie door een Seitz Entkeimungsfilter.

Het *kweken* geschiedde in groote Fernbach-kolven, welke een diameter hadden van 40 cm en een hoogte van 7 cm. Per kolf werd 2 Liter van den vloeibaren voedingsbodem gebruikt. De vloeistof had dan een laagdikte van 2 cm, zoodat er een zeer gunstige verhouding bestond tusschen oppervlakte en laagdikte. De zeer wijde halzen der kolven werden afgesloten door groote wattenproppen, waarin zich een buisje van circa 12 mm

doorsnede bevond. Nadat hierdoor de gewenschte hoeveelheid vloeistof steriel in de kolf gebracht was, werd dit buisje afgesloten met een rubber stop, waardoorheen een glazen hevelbuisje ging. Door middel van dit buisje, voorzien van een stukje slang, een klemkraantje en een glazen aftapklokje, kon op elk gewenscht tijdstip op steriele wijze een monster genomen worden. Door deze wijze van handelen, behoorden mislukkingen tengevolge van infectie tot de uitzonderingen. Vóór de enting werd bovendien de steriliteit van den voedingsbodem door 2—3 dagen bebroeden gecontroleerd.

Als *stam* werd steeds gebruikt de bekende Park-Williams 8, die regelmatig in ons laboratorium gebruikt wordt en welke wij indertijd van *Tomcsik* ontvingen. Eén dag voor de proef werd de stam op verse Löffler-serumbuizen overgeënt en de 24 uur oude cultuur met zoutsolutie afgeschud en hiermede de verschillende kolven geënt. Dit laatste geschiedde door, onder behoorlijk flambeeren, de rubberstop even van het meergenoemde buisje af te lichten. Nadat met behulp van een steriele pipet met slangetje de hevel was volgezogen, was de kolf voor de proef gereed. De bebroeding geschiedde bij 35—36° C.

De *monsterneming* geschiedde aldus, dat eerst in een steriel maatglaasje van 10 ccm \pm 8 ccm vloeistof opgevangen werd, welke als zijnde de inhoud van den hevel, werd verwijderd. Daarna werd in een grooter steriel maatglas de benodigde hoeveelheid afgeheveld.

Wat de *analysetechniek* betreft, kan het volgende medegedeeld worden. De *glucose*-, respectievelijk *maltosebepalingen* geschieden volgens de methode van *Luff*, uitvoerig door *Schoorl* ¹⁶⁾ beschreven, nadat eerst de peptonen met behulp van phosphorwolframzuur neergeslagen waren. (Zie *Seibert* ¹⁷⁾ en *Tasman* en *Pot* ¹⁸⁾). De gebruikte 2 %-peptonoplossing vertoonde een zeer geringe reductie tegenover het suikerproefvocht, welke bij iedere bepaling als blanco-correctie in rekening gebracht is.

De *waterstofionenconcentratie* (pH) werd bepaald met de waterstofelectrode tegenover de verzadigde calomelelectrode met behulp van een apparatuur volgens *Jan Smit*. ¹⁹⁾

De *toxinevorming* werd nagegaan door middel van de uitvlokreactie van *Ramon* ²⁰⁾ en uitgedrukt als A.W., d.w.z. het getal, dat aangeeft, hoeveel antitoxine-eenheden door één ccm

toxine gebonden wordt; bepaald tegenover een serumverdunding, welke 100 antitoxische eenheden per ccm bevatte. Door gebruik te maken van hoeveelheden van 5 ccm toxine per uitvlokbusje is voor de lagere waarden beneden A.W. = 3 een verschil van 0,2 in de A.W. nog met zekerheid te bepalen. Alle uitvlokkingen vonden plaats in een waterbad van 50° C.

Alle hierna te beschrijven proeven werden minstens in tweevoud uitgevoerd. Over het geheel genomen, was de overeenkomst tusschen de parallelproeven zéér goed. Slechts een enkele maal trad een of andere afwijking op, waarna het experiment herhaald werd. Ter ruimtebesparing zal van elk type slechts één proef in tabel en grafiek weergegeven worden.

In de eerste plaats werd nu nagegaan het beloop van de bovengenoemde grootheden in den *Pope*-bouillon, waarin zich ook het bij de neutralisatie van het toegevoegde azijnzuur ontstane natriumacetaat bevond. De resultaten hiervan zijn in tabel 1 en figuur 1 weergegeven.

TABEL 1.

POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose.

Uren bebroed	P _H	Glucose		A. W.
		absol. hoev. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,95	0,208	100	—
8	7,95	0,208	100	—
16	7,63	0,183	88	—
24	6,95	0,114	55	—
28	6,64	0,049	24	—
32	6,61	0,008	4	—
36	6,87	—	—	3
40	7,14	—	—	4,5
50	7,78	—	—	8
62	8,21	—	—	12
74	8,28	—	—	15,5
86	8,49	—	—	17
99	8,66	—	—	17
122	8,71	—	—	17
146	8,87	—	—	17

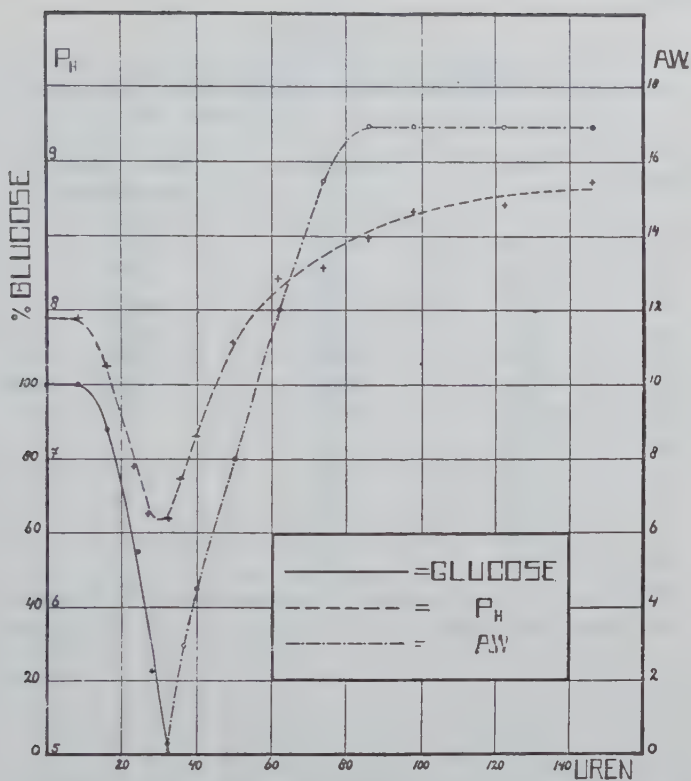


Fig. 1. POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose.

Hieruit blijkt, dat de glucose in circa 34 uur uit de vloeistof verdwenen is, terwijl even voor dit tijdstip de toxinevorming begint. Deze laatste verloopt daarna met nagenoeg constante snelheid, totdat de maximumwaarde bereikt is, terwijl na dit tijdstip geen verandering in de A.W. meer optreedt. Terloops zij opgemerkt, dat wij bij al onze proeven een dergelijk gedrag waarnamen. Het beloop van de waterstofionenconcentratie volgt in den beginne de suikerontleding. Zoodra deze laatste bijna of geheel beëindigd is, treedt de bekende omslag naar voren en stijgt de pH eerst snel, daarna langzaam. Op een mogelijke verklaring van dit gedrag zal later teruggekomen worden.

Om den invloed van het zich bij de eerste proef in den voedingsbodem bevindende acetaat, respectievelijk glucose, afzonderlijk te kunnen beoordeelen, werden twee experimenten uitgevoerd, waarbij het acetaat, respectievelijk de glucose, achterwege gelaten werden, terwijl omgekeerd glucose, respec-

tievelijk acetaat, wèl toegevoegd werden. De resultaten van deze proeven zijn in de tabellen 2 en 3 en figuur 2 en 3 bijeengebracht.

TABEL 2.
POPE-medium met 0,2 % glucose, zonder acetaat.

Uren bebroed	P _H	Glucose		A. W.
		absol. hoev. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,89	0,190	100	—
8	7,89	0,190	100	—
16	7,61	0,181	96	—
24	7,11	0,115	61	—
28	6,54	0,050	26	—
32	6,42	0,011	6	—
36	6,40	—	—	2
40	6,72	—	—	3
50	7,07	—	—	3½
62	7,40	—	—	5
74	7,76	—	—	6
85	7,87	—	—	7½
98	7,97	—	—	8½

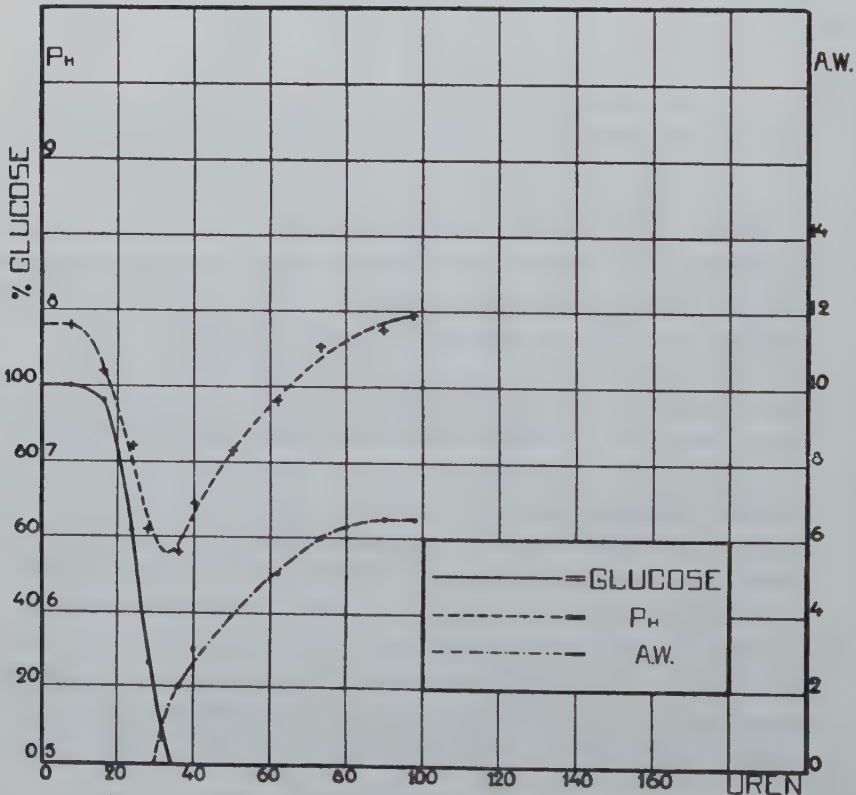


Fig. 2. POPE-medium met 0,2 % glucose, zonder acetaat.

TABEL 3.

POPE-medium met acetaat, zonder glucose.

Uren bebroed	P _H	A. W.
0	7,94	—
16	7,92	—
24	7,87	—
30	7,95	—
39	8,14	1,8
53	8,30	2,9
64	8,44	3,5
76	8,58	4
88	8,68	4,2
111	8,85	4,2
136	8,95	4,2

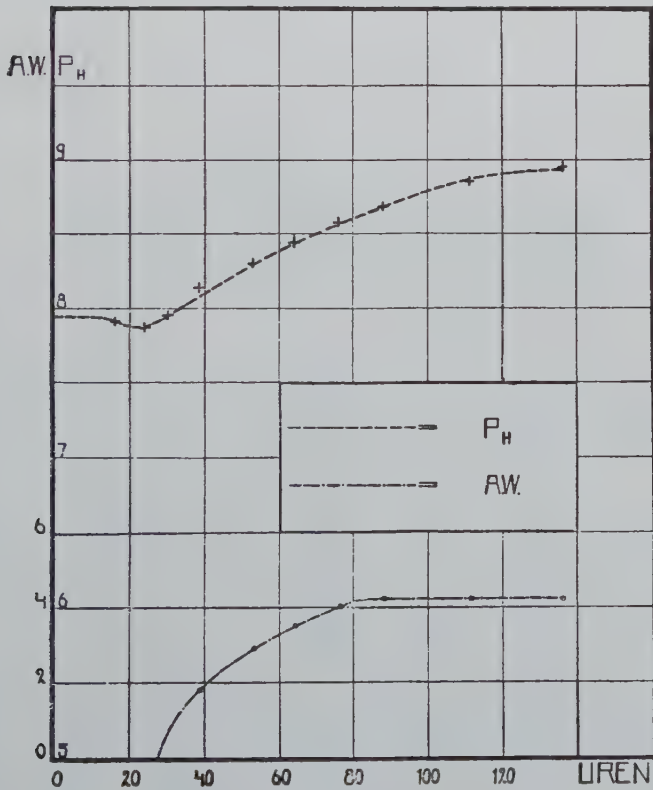


Fig. 3. POPE-medium met acetaat, zonder glucose.

Bij onderlinge vergelijking van de figuren 2 en 3 met de eerste grafiek valt op te merken, dat de glucoseontleding in de tweede proef, ondanks de afwezigheid van het acetaat, met nagenoeg dezelfde snelheid verliep als in het eerste experiment het geval was. Ook de toxinevorming begon hierbij weer even vóórdat de glucose geheel uit de oplossing verdwenen was, doch bleef in de tweede en in versterkte mate in de derde proef aanmerkelijk bij die van het eerste experiment ten achter. De P_H -curve bij proef 2 is in wezen gelijk aan die van proef 1. Bij proef 3 is de geringe pH-daling in het begin vermoedelijk te wijten aan sporen koolhydraten, welke in de gebruikte pepton aanwezig waren en bij hun ontleding een geringe zuurvorming veroorzaakten.

Ter completeering van deze reeks werd een proef genomen, waarbij zoowel de toevoeging van glucose als van acetaat achterwege gelaten was. Het resultaat vindt men in tabel 4 en figuur 4.

TABEL 4.

POPE-medium **zonder** acetaat en **zonder** glucose.

Uren bebroed	P_H	A. W.
0	7,92	—
16	7,95	—
24	7,70	—
30	7,76	0,6
41	7,92	1,0
48	7,92	1,0
53	7,95	1,0
65	8,13	1,0
78	8,21	1,0
89	8,30	1,0
113	8,39	1,0

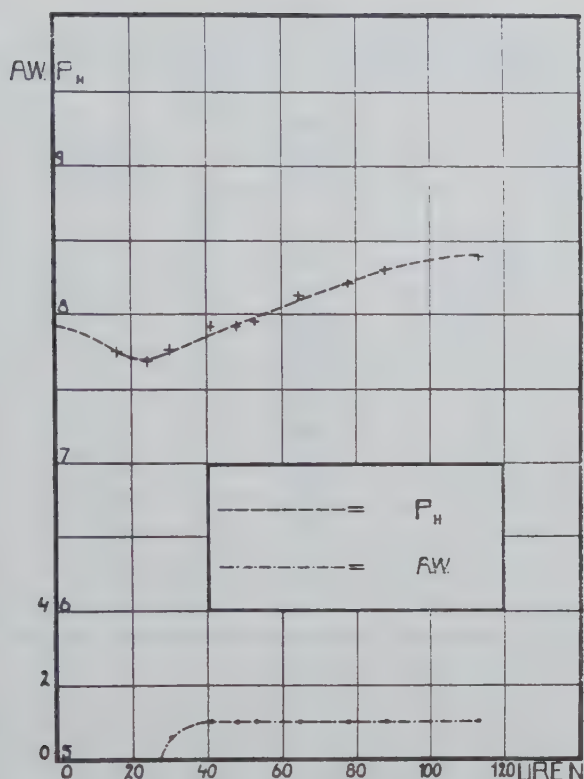


Fig. 4. POPE-medium zonder acetaat en zonder glucose.

Wat de toxinevorming betreft, deze blijft in nog sterkere mate bij die van de vorige experimenten ten achter. Over het pH-belooft, speciaal wat betreft de geringe daling in het begin van de proef, valt dezelfde opmerking te maken als bij het derde experiment.

Daar uit verschillende voorproeven van ons, in overeenstemming met de meeste opgaven in de literatuur, gebleken was, dat de optimale glucoseconcentratie bij 0,2 % ligt, was het interessant om na te gaan, wat het gedrag van een diphtheriekweek zou zijn, waarbij aan den voedingsbodem, onder overigens gelijke omstandigheden, een grootere hoeveelheid glucose toegevoegd was. Wij verrichtten daarom een proef, waarbij in het substraat 0,5 % glucose aanwezig was. De resultaten hiervan zijn te vinden in tabel 5 en figuur 5.

TABEL 5.

POPE-medium met acetaat en 0,5 % glucose.

Uren bebroed	P _H	Glucose		A. W.
		absol. hoeve. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	8,09	0,510	100	—
8	8,09	0,510	100	—
16	7,77	0,498	98	—
24	7,34	0,471	92	—
32	6,72	0,363	71	—
36	6,05	0,267	52	1,2
40	5,66	0,194	38	1,3
50	5,31	0,093	20	1,0
61	5,16	0,042	8	—
72	5,16	0,020	4	—
96	5,16	0,002	1	—
120	5,16	—	—	—
144	5,15	—	—	—

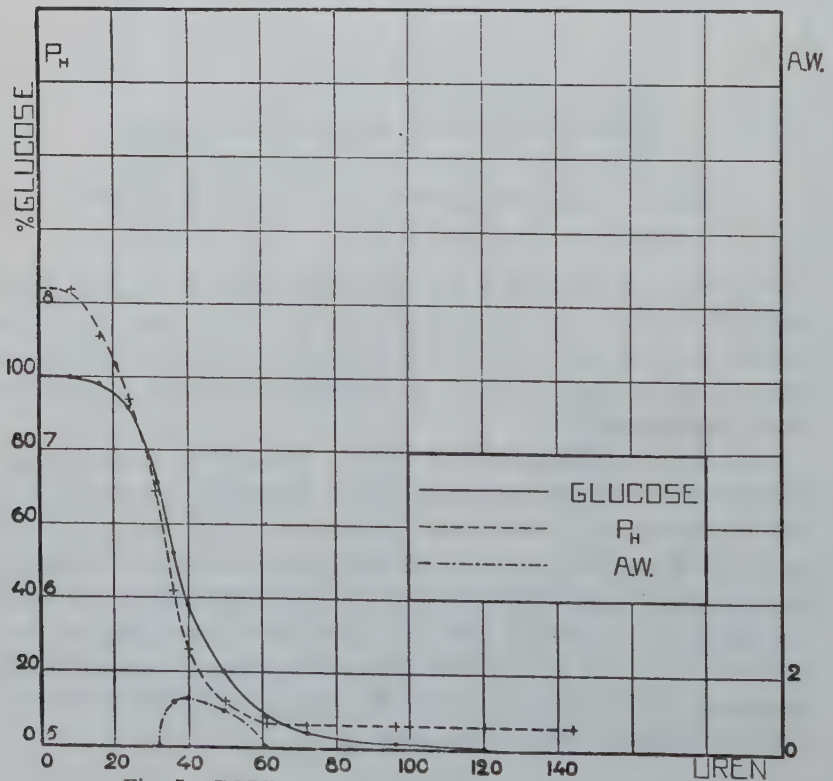


Fig. 5. POPE-medium met acetaat en 0,5 % glucose.

Hoewel de diphtheriebacteriën uiteindelijk wèl in staat zijn deze relatief groote hoeveelheid glucose te verwerken, daalt de pH daarbij echter zóó sterk, dat, nadat de suiker uit de oplossing verdwenen is, de omstandigheden voor een verdere ontwikkeling te ongunstig geworden zijn. Van een pH-omslag is dan ook geen sprake. Toxine wordt slechts in zéér geringe mate gevormd en wordt, kennelijk door de te hooge zuurgraad, in het verloop van de proef verder vernietigd; is dan althans voor de bepaling via de uitvlokreactie ontoegankelijk.

In de laatste jaren is het gebruik van *maltose* in plaats van *glucose* in de diphtherievoedingsbodems meer en meer op den voorgrond getreden. In het algemeen bereikt men hiermede betere resultaten, dan vroeger met glucose het geval was. *Ström* e.a. meenen de reden hiervan te moeten zoeken in het feit, dat de maltose langzaam in glucose gesplitst zou worden, waardoor de diphtheriebacteriën dus ruimschoots de gelegenheid zouden hebben de ontledingsproducten van de gevormde glucose verder te verwerken, waarbij een geringere pH-daling op zou treden. Tevens zou dan de groeiende kweek gedurende langeren tijd van een kleine hoeveelheid glucose voorzien worden.

Het lag dus voor de hand, onze proeven ook op dit gebied uit te breiden en na te gaan, hoe het beloop van de suiker-, respectievelijk de pH- en A.W.-curven zou zijn bij gebruik van maltose in plaats van glucose. Daar uit enkele voorproeven gebleken was, dat de diphtheriebacteriën in het *Pope*-medium maltose tot een concentratie van 1 % verdragen, deden wij twee proeven, waarbij respectievelijk 1,0 % en 0,3 % maltose aan den voedingsbodem toegevoegd was. De laatste concentratie werd gekozen in verband met een routine voedingsbodem, waaraan een dergelijke hoeveelheid maltose toegevoegd wordt.

De gebruikte maltose was met één uitzondering (proef 6), afkomstig van de firma Hoffman-La Roche & Co. te Basel en vertoonde de volgende kenmerken:

Kleur: wit.

Oplosbaarheid in water (1 + 1): volledig.

Reactie tegenover lakmoes: neutraal.

Aschgehalte: sporen.

$[\alpha]_D^{20}$ (C = 50 in H₂O): 128°,4 (opgave 128°,5).

In een 10%-oplossing van deze suiker in water was biologisch door enting met een dikke suspensie van *Torula Monosa* (*Kluyver*²¹) geen glucose aan te toonen.

De resultaten van deze proeven zijn vermeld in de tabellen 6 en 7 en in de figuren 6 en 7, grafisch weergegeven.

TABEL 6.
POPE-medium met acetaat en 1 % maltose.

Uren bebroed	P _H	Maltose		A. W.
		absol. hoef. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,96	0,866	100	—
7	7,90	0,866	100	—
14	7,49	0,845	98	—
24	6,92	0,820	94	—
36	6,49	0,774	89	1,0
48	6,76	0,740	85	2,5
60	6,80	0,693	80	4,5
73	7,11	0,632	73	9
84	—	0,593	69	12,5
96	—	0,550	64	18,6
108	7,78	0,509	59	21,5
120	7,98	0,481	55	23
132	7,98	0,431	50	24
144	8,16	0,395	46	25
168	8,29	0,316	36	25,5
192	8,28	0,252	29	26
216	8,40	0,201	23	26
242	8,49	0,177	20	26
264	8,63	0,160	18	26
312	8,82	0,151	17	26
384	8,97	0,140	16	26

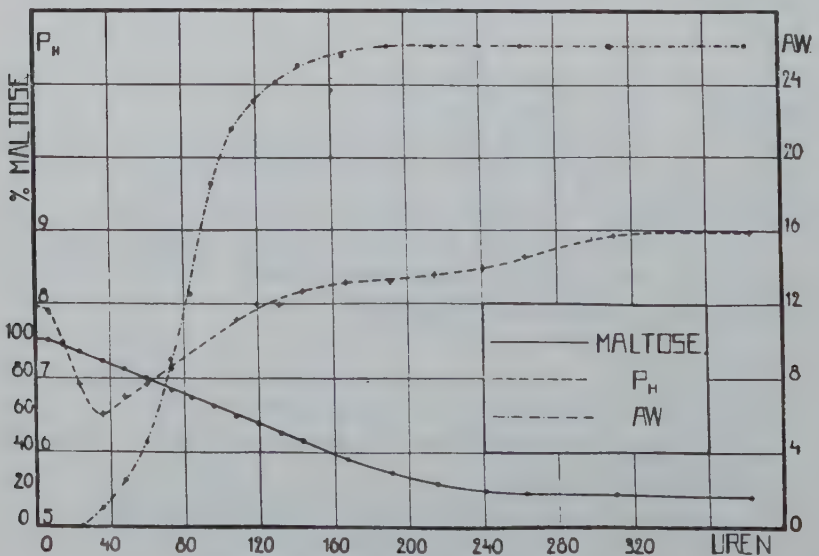


Fig. 6. POPE-medium met acetaat en 1 % maltose.

TABEL 7.

POPE-medium met acetaat en 0,3 % maltose.

Uren bebroed	P _H	Maltose		A. W.
		absol. hoeve. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,99	0,289	100	—
7	7,92	0,280	97	—
14	7,61	0,270	94	—
24	7,68	0,258	89	—
37	7,80	0,216	74	3,5
49	8,06	0,177	61	—
61	8,12	0,147	51	17
72	8,30	0,127	44	20
84	8,44	0,108	37	22,5
96	8,49	0,092	32	24
120	8,63	0,064	22	28
144	8,83	0,043	15	29
168	8,95	0,043	15	29
217	9,18	0,043	15	29
264	9,28	0,043	15	29
312	9,28	0,043	15	29

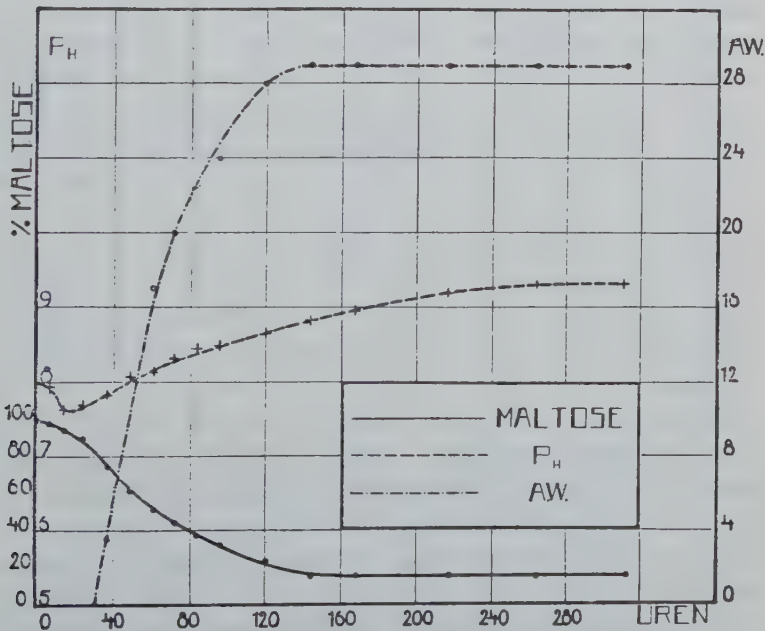


Fig. 7. POPE-medium met acetaat en 0,3 % maltose.

Bij de beschouwing van de tabellen 6 en 7 en de bijbehorende figuren valt direct op, dat inderdaad de maltose slechts langzaam ontleed wordt, respectievelijk niet geheel uit de oplossing verdwijnt. Waaraan dit laatste verschijnsel toegeschreven moet worden zij voorloopig in het midden gelaten. De pH daalt betrekkelijk weinig en loopt langzaam op. Merkwaardig is in dit verband de tweede pH-stijging, welke bij de proef met 1 % maltose (zie figuur 6) na ongeveer 220 uur te voorschijn komt. Dat dit geen toevallig verschijnsel is, hebben wij door verschillende contrôleproeven kunnen vaststellen. Indien 1 % maltose toegevoegd wordt, daalt de concentratie hiervan gedurende geruimen tijd vrijwel lineair, om na ± 170 uur langzamer te verlopen. Duidelijk valt op te merken, dat de toevoeging van maltose in plaats van glucose aan den voedingsbodem de toxinevorming zeer ten goede komt. Het meest sprekend is dit in de proef met 0,3 % maltose. Verder zij hier opgemerkt, dat de proeven met 0,3 % maltose een regelmatigere en constantere toxineproductie te zien gaven, dan bij toevoeging van 1 % van deze suiker het geval was.

Daar de diphtheriebacteriën eenerzijds niet meer dan 0,2 % glucose zonder schade tegenover de toxineproductie ontleiden kunnen, anderzijds een hoeveelheid van 1 % maltose vlot verwerken, rijst de vraag, waaraan het vermogen om een zooveel grootere hoeveelheid maltose te ontleiden toe te schrijven is. Zooals reeds eerder medegedeeld werd, opperde *Ström* de verklaring, dat de maltose slechts langzaam in glucose gesplitst zou worden, waardoor den bacteriën de gelegenheid geboden zou worden als het ware op hun gemak deze kleine hoeveelheden glucose te splitsen en vervolgens de hieruit ontstane reactieproducten, en wel meer in het bijzonder de gevormde zuren, door oxydatie tot koolzuur en water, verder onschadelijk te maken.

Op grond van de verhouding 0,2 % glucose: 1 % maltose kan men reeds vermoeden, dat de onleding van glucose minstens vijf maal sneller moet verlopen dan de vorming hiervan door hydrolytische splitsing van de moederstof maltose. Het leek ons nu interessant deze veronderstelling experimenteel te toetsen, respectievelijk de verhouding der beide snelheden iets nauwkeuriger te bepalen. Wij deden daartoe de volgende proef. Van één stamoplossing (acetaat bevattende) werd aan de eene

helft 0,2 % glucose, aan de andere helft 0,2 % maltose toegevoegd. Iedere hoeveelheid werd over twee kolven (elk 2 L. bevattende) verdeeld, zoodat dus zoowel de glucose- als de maltosebepalingen in duplo konden geschieden. Op bepaalde tijdstippen werd nu de suikerconcentratie in de vier kolven bepaald. De pH- en A.W.-bepalingen werden bij deze proef achterwege gelaten. De resultaten zijn vermeld in tabel 8 en in figuur 8 in tekening gebracht. Betreffende figuur 8 dient nog opgemerkt te worden, dat de hierin weergegeven relatieve glucose- en maltoseconcentraties de gemiddelden zijn van de afzonderlijke waarden in de duplokolven.

TABEL 8.

POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose, resp. 0,2 % maltose.

Uren be- broed	Glucose					Maltose				
	Kolf 1		Kolf 2		gemidd. relat. hoev.	Kolf 3		Kolf 4		gemidd. relat. hoev.
	absol. hoev. in %	% van oorspr. hoev.	absol. hoev. in %	% van oorspr. hoev.		absol. hoev. in %	% van oorspr. hoev.	absol. hoev. in %	% van oorspr. hoev.	
0	0,185	100	0,205	100	100	0,152	100	0,193	100	100
7	0,185	100	0,205	100	100	0,189	98	0,189	98	98
15	0,175	95	0,192	94	94,5	0,178	93	0,179	93	93
23	0,155	83	0,153	75	79	0,144	91	0,175	91	91
27	0,120	65	0,096	47	56	—	—	—	—	—
31	0,078	41	0,028	14	27,5	0,161	84	0,166	86	85
35	0,038	20	0,007	4	12	—	—	—	—	—
47	—	—	—	—	—	0,132	68	0,138	72	70

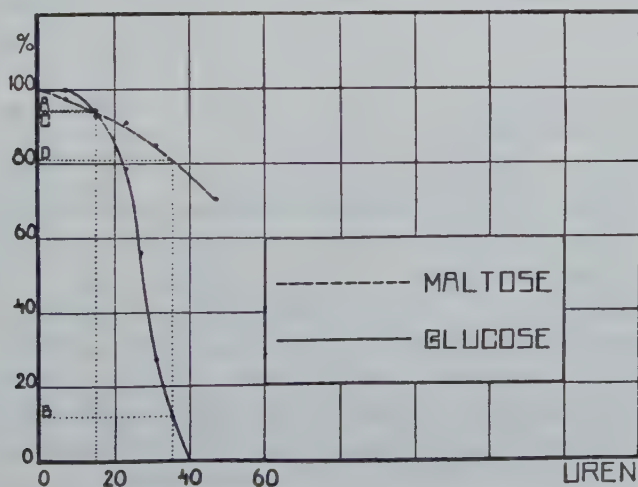


Fig. 8. POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose, resp. 0,2 % maltose.

De verhouding der snelheden van de glucose-ontleding en de hydrolytische splitsing van maltose in glucose werd nu grafisch als volgt afgeleid. De glucose-ontleding verloopt gedurende het tijdvak, gelegen tusschen 15 en 35 uur na de enting (het steilste stuk van de curve) met ongeveer constante snelheid. Dit komt dus overeen met het stuk tusschen de punten A en B. Gedurende dit tijdsverloop daalt de relatieve glucose-concentratie van 95 % tot 12 %, dus met 83 %. Gedurende ditzelfde tijdsverloop daalt de relatieve maltose-concentratie van 94 % tot 81 %, dus met 13 %. De gevraagde verhouding der snelheden kan dus ruwweg op $\frac{83}{13} =$ circa 6 berekend worden. M.a.w. de uit de maltose door hydrolytische splitsing gevormde glucose wordt ongeveer zesmaal sneller *ontleed* dan uit de moederstof maltose *gevormd*. Deze uitkomst sluit zich zeer goed aan bij het bij oppervlakkige beschouwing afgeleide verhoudingscijfer ≥ 5 .

Op grond van deze feiten is het dan ook niet te verwachten, dat in de substraten, waaraan maltose toegevoegd is, gedurende de bebroeding, naast maltose, glucose aantoonbaar zal zijn.

Wij herhaalden een proef met het *Pope*-medium, dat naast acetaat 1 % maltose bevatte. Na 9, 21 en 312 uur bebroeding, werd uit de proefkolf een monster van 500 ccm genomen en deze monsters door verhitten op het waterbad tot de 10-voudige concentratie ingedampt. Deze laatste vloeistoffen bevatten respectievelijk 9,17; 8,60 en 1,76 % suiker als maltose berekend. De heer *L. H. C. Perquin*, chem. docts., was zoo vriendelijk om onder leiding van Prof. *A. J. Kluyver* te trachten in deze monsters langs biochemischen weg, naast de aanwezige maltose, eventueel aanwezige glucose te bepalen. Zonder nader op de bijzonderheden van deze proeven in te gaan, kan volstaan worden met de mededeeling, dat het hem niet gelukte in deze vloeistoffen glucose aan te toonen. Beide heeren betuigen wij ook te dezer plaatse onzen hartelijken dank voor hun medewerking.

Tot nu toe bevatten alle substraten dezelfde stikstofbron, n.l. Difco-proteosepepton. Het leek belangwekkend om ook andere stikstofbronnen in dit onderzoek te betrekken. In de eerste plaats kozen wij daarvoor de bekende Pepton-Witte van Rostock. De hiermede bereide voedingsbodem had geheel dezelfde samenstelling als het *Pope*-medium, met dit eene verschil, dat de 2 % proteosepepton door 2 % pepton-Witte ver-

vangen was. Het resultaat van deze proef is vermeld in tabel 9, respectievelijk figuur 9.

TABEL 9.

POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose.
Proteosepepton door Witte-pepton vervangen.

Uren bebroed	P _H	Glucose		A. W.
		absol. hoeve. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,95	0,190	100	—
8	7,95	0,190	100	—
16	7,95	0,190	100	—
24	7,95	0,190	100	—
40	7,85	0,183	96	—
49	7,61	0,176	93	—
55	7,58	0,168	88	—
63	7,42	0,149	78	—
72	7,23	0,113	59	—
79	6,89	0,082	43	—
86	6,70	0,047	25	—
97	6,49	0,004	2	1,2
110	6,42	—	—	1,2
121	6,61	—	—	1,2
136	6,70	—	—	1,2
156	6,77	—	—	1,2
194	6,77	—	—	1,2

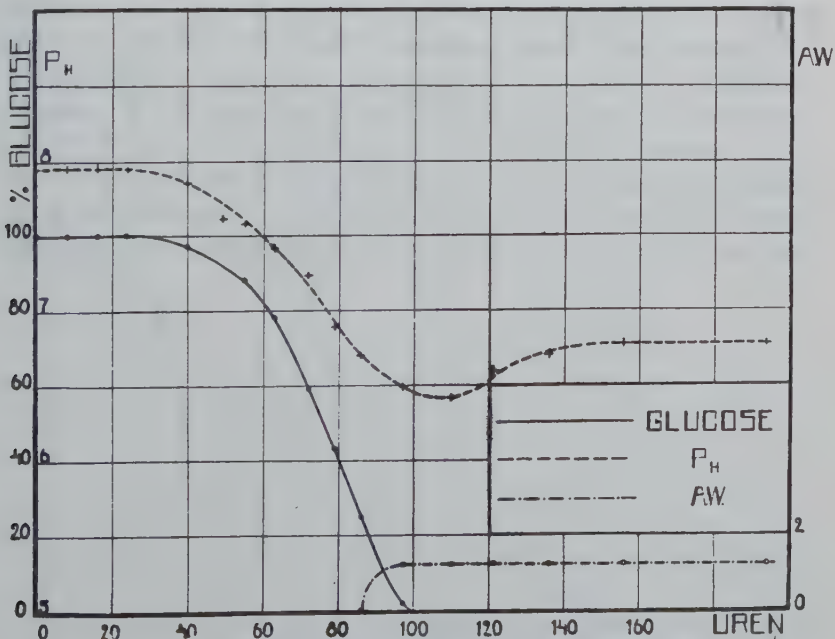


Fig. 9. POPE-medium met acetaat en 0,2 % glucose.
Proteosepepton door Witte-pepton vervangen.

Opvallend was de slechte groei en geringe filmvorming. Deze peptonsoort, hoewel vroeger vrij algemeen in gebruik zijnde voor de bereiding van diphtherie-voedingsbodems, eigent zich blijkbaar slecht voor het gebruik als uitsluitende stikstofbron en staat in dit opzicht zeer ver ten achter bij de in de tot nu toe beschreven proeven gebezigde Difco-proteosepepton. Quantitatief uit zich dit dan ook in een sterk vertraagde en langzaam verlopende suikerontleding. Ook de pH daalt langzaam en vertoont slechts een zeer geringen omslag. De toxinevorming is uiterst gering. Merkwaardig is echter, dat ook bij deze proef de vorming van het toxine aanvangt even voordat de glucose geheel uit de oplossing verdwenen is.

Tenslotte werden nog twee andere voedingsbodems in dit onderzoek betrokken, welke gemakshalve aangeduid zullen worden met de benamingen waaronder ze in ons Instituut bekend zijn, n.l. de *Tomcsik*- en de *Bandoeng*-bodem. Het *Tomcsik*-medium wordt in hoofdzaak bereid volgens het bekende voorschrift van *Martin* (vleesextract + pepton van varkensmagen), onder toevoeging van 0,5 % natriumacetaat en 2 % glucose, terwijl de *Bandoeng*-bodem zich van de zoo juist genoemde, behalve op enkele punten van ondergeschikt belang, onderscheidt door het feit, dat in plaats van 0,2 % glucose, 0,3 % maltose toegevoegd wordt. De pH van den *Tomcsik*-bodem wordt op 7,6, die van het *Bandoeng*-medium op 8,0 gebracht. De resultaten in deze proeven verkregen, zijn in de tabellen 10 en 11 en de overeenkomstige figuren weergegeven.

TABEL 10.

TOMCSIK-medium met 0,5 % natriumacetaat en 2 % glucose.

Uren bebroed	P _H	Glucose		A. W.
		absol. hoev. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,46	0,199	100	—
8	7,46	0,199	100	—
16	7,40	0,199	100	—
24	7,18	0,179	90	—
28	6,96	0,164	82	—
32	6,57	0,141	71	—
36	6,23	0,100	50	—
40	5,88	0,157	29	1,0
50	6,55	—	—	6,5
62	7,61	—	—	10
73	8,25	—	—	13
86	8,35	—	—	13
97	8,47	—	—	13
121	8,76	—	—	13
145	8,92	—	—	13

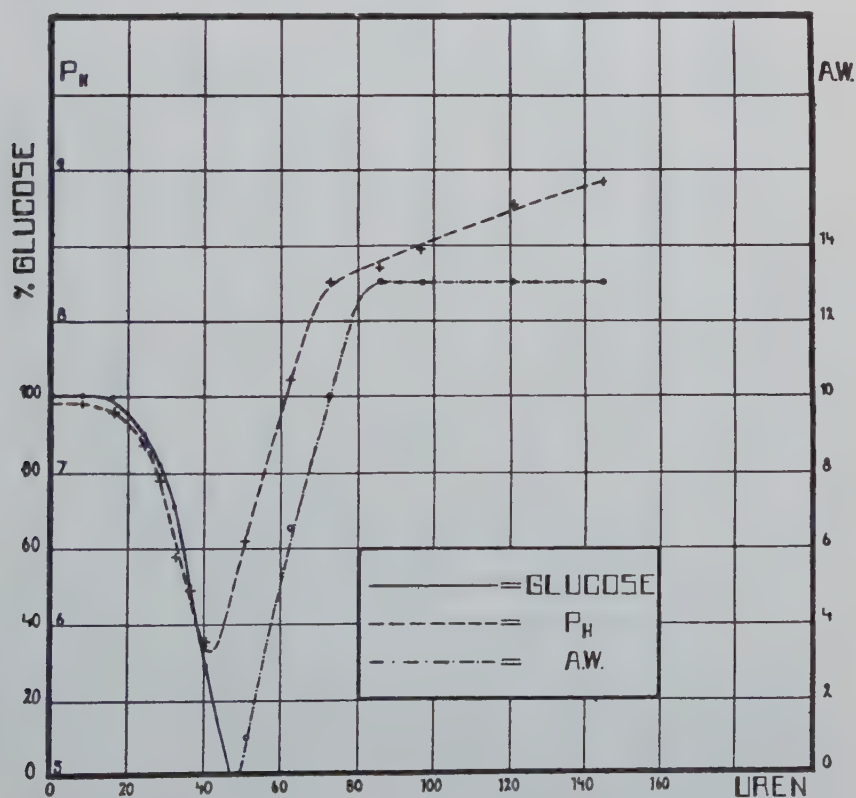


Fig. 10. TOMCSIK-medium met 0,5 % natriumacetaat en 2 % glucose.

TABEL 11.

Bandoeng-medium met 0,5 % natriumacetaat en 0,3 % maltose.

Uren bebroed	P _H	Maltose		A. W.
		absol. hoeve. in %	% van oorspr. hoeveelheid	
0	7,94	0,276	100	—
12	—	0,276	100	—
24	7,88	0,276	100	—
48	7,63	0,261	95	—
60	7,56	0,229	83	1,0
72	7,85	0,190	68	—
74	—	—	—	7,8
79	7,99	0,174	63	9
84	8,04	0,169	61	—
96	8,14	0,145	53	—
120	8,49	—	—	—
123	—	—	—	18
145	8,64	0,112	41	19
169	8,87	0,105	38	19
126	9,02	0,101	33	19
266	9,16	0,101	33	19

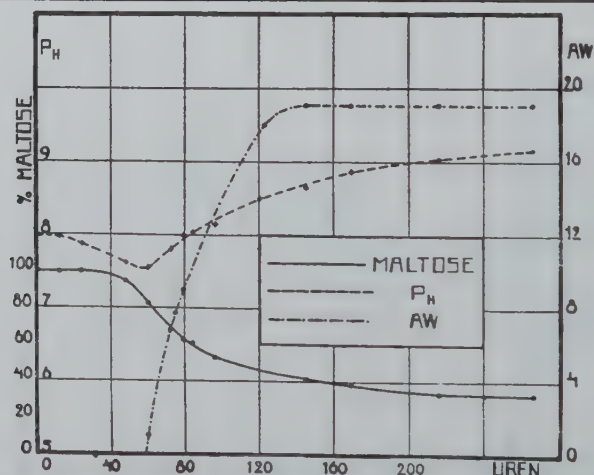


Fig. 11. Bandoeng-medium met 0,5 % natriumacetaat en 0,3 % maltose.

Bij nadere beschouwing van deze resultaten, blijken deze proeven zich voortreffelijk aan te sluiten bij de overeenkomstige met het oorspronkelijke *Pope*-medium met 0,2 % glucose, respectievelijk 0,3 % maltose (zie de tabellen 1 en 7 en de overeenkomstig genummerde figuren) en behoeven dus geen nadere beschouwing.

Bespreking der resultaten.

Wanneer wij nu trachten de verkregen resultaten in onderling verband te overzien, dan richten wij in de eerste plaats onze aandacht op *de snelheid der suikerontleding*. In de onderstaande tabel is een samenvattend overzicht hiervan gegeven.

TABEL 12.

Overzicht van de snelheid der suikerontleding in de verschillende voedingsmedia.

Voedingsbodem	Peptonsoort	Aanwezigheid van acetaat	Gebruikte suiker	Tijdstip, waarop de suiker verdwenen is
Pope-medium .	Difco-proteose	+	0,2 % glucose	32 uur
"	"	—	" "	34 "
"	"	+	0,5 % "	120 "
"	"	+	1 % maltose	∞ "
"	"	+	0,3 % "	∞ "
"	Witte	+	" "	98 "
Tomcsik . . .	Varkensmaag	+	0,2 % glucose	43 "
Bandoeng . . .	"	+	0,3 % maltose	∞ "

Het blijkt, dat de diphtheriebacteriën wel in staat zijn glucose tot een maximum concentratie van 0,5 % volledig te ontleden, terwijl in de proeven, waarbij maltose in plaats van glucose toegevoegd was, deze suiker nooit geheel uit het substraat verdween. Waaraan dit laatste verschijnsel toe te schrijven is, valt moeilijk te overzien. Ondanks den goeden groei in den aanvang en gedurende de eerste dagen der proef, treedt er op een bepaald oogenblik kennelijk een vertraging, respectievelijk stilstand in de stofwisseling op, waardoor de dan nog aanwezige suiker niet verder ontleed wordt. Vermoedelijk spelen hier factoren, de stikstofstofwisseling betreffende, een rol. Doch zoolang over dit laatste onderwerp geen nadere gegevens bekend zijn, valt hierover weinig meer te zeggen.

Wat de snelheid der glucose-ontleding betreft, blijkt deze weinig of niet afhankelijk te zijn van de al of niet aanwezigheid van acetaat. Zooveel te meer echter van andere factoren en wel in het bijzonder van den aard der aanwezige stikstofbron.

In dit opzicht blijkt de combinatie van vleeschextract + varkensmaagpepton in het *Tomcsik*-medium practisch gelijkwaardig te zijn aan de Difco-proteosepepton in het *Pope*-medium. Geheel anders gedraagt zich echter de *Witte*-pepton, welke een zeer slechten groei en dientengevolge een langzame suikerontleding veroorzaakt. Dat in het *Pope*-medium met 0,5 % glucose deze suiker in den beginne snel, doch later langzaam volledig verbruikt wordt, is vermoedelijk uitsluitend te wijten aan de in de latere stadia der proef optredende hooge zuurgraad, waardoor de groei en de stofwisseling in hooge mate ongunstig beïnvloed worden.

Bezien wij nu *de verandering van de waterstofionenconcentratie* in de verschillende proeven, dan valt hierover het volgende te zeggen. In alle gevallen, waarin glucose direct of indirect via de vorming uit maltose door de bacteriën ontleed wordt, daalt de pH meer of minder sterk. Dat dit een gevolg is van het ontstaan van verschillende zuren uit de afgebroken glucose, behoeft natuurlijk geen nader betoog. De daling van de pH is des te sterker, naarmate er meer glucose beschikbaar is. Bij de proeven, waarbij 0,2 % glucose toegevoegd was, werd als laagste pH 5,88 waargenomen (*Tomcsik*-medium), terwijl de proef met 0,5 % glucose een pH-daling tot 5,15 te zien gaf. Dat deze laagste pH-waarde, respectievelijk het beloop van de pH-curve tevens van de buffercapaciteit van het gebruikte medium (peptonsoort, al of niet aanwezig zijn van acetaat, enz.) afhankelijk is, spreekt vanzelf.

Waaraan is nu de stijging van de pH, die in de voor de bacteriën physiologisch normale gevallen steeds valt waar te nemen, toe te schrijven? De samenstellers van de reeds genoemde monografie „Diphtheria” spreken op dit punt als hun vermoeden uit, dat de bacteriën deze zuren, nadat ze zich tot een bepaalde concentratie opgehoopt hebben, verder oxydeeren tot carbonaten, welke een sterk alcalische reactie zouden veroorzaken en aldus de omkeer van de pH-curve verklaarbaar maken. Hoewel het experimenteele bewijs voor deze veronderstelling nog ontbreekt, pleit hiervoor ten zeerste het feit, dat in alle gevallen van directe glucose-ontleding het pH-minimum practisch samenvalt met het verdwijnen van de suiker uit den voedingsbodem. Men zal het zich dus zóó moeten voorstellen, dat de glucose als zoodanig een gemakkelijk toegankelijke

energiebron van groote waarde is, welke eerst nagenoeg volledig opgebruikt wordt, voordat de kennelijk minder gemakkelijk aantastbare, eventueel minder rijke energiebron der zuren aangetast wordt. Hiermede in overeenstemming is het feit, dat de pH bij de proeven, waarbij maltose als koolstofbron gebruikt wordt, minder sterk daalt en het minimum der pH-curve minder scherp begrensd is. In deze gevallen van indirecte glucose-ontleding treden dus de beide processen: splitsing der glucose in zuren en oxydatie dezer zuren tot carbonaten ten deele naast elkaar op. Tenslotte moet in dit verband nog getracht worden, een verklaring te vinden voor de tweede stijging in de pH-curve, welke bij de proeven met 1 % maltose waargenomen werd. Ook hier kan slechts van een vermoeden gesproken worden. Op het moment, dat deze tweede stijging zich openbaart (na ± 220 uur, zie figuur 6) is de suikerontleding, respectievelijk de toxinevorming, practisch tot stilstand gekomen. Er zal op dit tijdstip dus vermoedelijk geen zuur meer in de vloeistof aanwezig zijn, dat door verdere oxydatie tot carbonaat de pH kan doen stijgen. De gedachte ligt nu voor de hand, dat deze tweede pH-stijging te wijten zou kunnen zijn aan een extra ammoniak-productie uit de aanwezige pepton. Zooals gezegd, berust deze veronderstelling slechts op vermoedens en ontbreekt hiervoor voorloopig nog het experimenteel bewijs.

Richten wij tenslotte onze aandacht op de *toxinevorming*, dan kunnen wij dit verschijnsel in drie deelen splitsen, te weten:

- a) het moment, waarop de toxinevorming begint,
- b) de snelheid, waarmede deze plaats vindt,
- c) de maximum waarde, die bereikt wordt.

Wat het eerste punt betreft, geven de proeven met glucose het meest eenvoudige beeld te zien. Bij al deze proeven blijkt de toxinevorming op te treden op het moment, dat de glucose practisch uit de vloeistof verdwenen is. In de onderstaande tabel 13 is het moment, waarop de toxinevorming begint (dat slechts bij benadering grafisch afgeleid kan worden) weergegeven. Tevens zijn hierin de maximum waarden opgenomen.

TABEL 13.

Overzicht der toxineproductie in de verschillende media.

Voedingsbodem	Begin der antigeen- vorming	Max. antigeen- waarde
Pope-medium, proteose pepton, acetaat, 0,2 % glucose	na 30 uur	17
" " " , geen acetaat, 0,2 % glucose	" 28 "	6,5
" " " , acetaat, geen glucose	" 30 "	4,2
" " " , geen acetaat, geen glucose	" 24 "	1,0
" " " , acetaat, 0,5 % glucose	" 32 "	1,3
" " " , acetaat, 1 % maltose	" 24 "	26
" " " , acetaat, 0,3 % maltose	" 31 "	29
" Witte " , acetaat, 0,2 % glucose	" 85 "	1,2
Tomcsic, Varkensmaag " , acetaat, 0,2 % glucose	" 49 "	13
Bandoeng, " , acetaat, 0,3 % maltose	" 58 "	19

Dat dit beginpunt ongeveer met het pH-minimum samenvalt, ook bij de proeven met maltose, treedt bij beschouwing der verschillende figuren duidelijk naar voren.

De vraag rijst nu, of uit deze verschijnselen iets af te leiden valt betreffende den aard van het proces der toxinevorming. Onder groote reserve zij hieronder onze meening in deze weergegeven. Wanneer men een voedingsvloei-stof met een bacterie-cultuur, in casu diphtheriebacteriën ent, zullen deze micro-organismen zich na een zekere „lag-time” beginnen te deelen en te vermenigvuldigen. In eerste instantie is de hierbij plaats hebbende stofwisseling een zoodanige, waarbij in de eerste plaats de gemakkelijkst toegankelijke energiebronnen, zooals koolhydraten (bij voorkeur glucose), acetaat, enz., aangetast worden. Nadat de cultuur eenmaal een zekere dichtheid verkregen heeft en de eerstgenoemde energiebronnen opgebruikt zijn, zal de dissimilatorische stofwisseling meer op den voorgrond treden. In dit verband hebben wij meer in het bijzonder het oog op de dissimilatorische stikstofstofwisseling, m.a.w. de afbraak van de in de pepton aanwezige complexe stikstofverbindingen.

Uit proeven op ander gebied, n.l. dat der zuivering en concentratie van diphtherie-toxine en -anatoxine²²⁾ is ons gebleken, dat het toxine òf een eiwit, òf een aan eiwit gebonden stof is.

Het laat zich n.l. op geheel overeenkomstige wijze als dit met andere eiwitten het geval is, door ammoniumsulfaat uitzouten, adsorbeeren aan aluminiumhydroxydesuspensie, enz.

In verband met het bovenstaande en de waargenomen feiten, meenen wij nu de toxinevorming op te mogen vatten als in hoofdzaak een gevolg van de dissimilatorische stikstofstofwisseling. Men zou hiertegen aan kunnen voeren, dat het hier dan toch om *opbouw*- en niet om *afbraak*producten gaat. Ongetwijfeld zal men, aannemende dat het toxine een eiwit, respectievelijk een zich als eiwit gedragende stof is, het antigeen niet als een afbraakproduct der peptonen op mogen vatten. *Kluyver* ²³⁾ heeft echter in verband met de onderzoekingen van *Meyerhof* e.a. over het mechanisme der spiercontractie aangetoond, dat het in vele gevallen der bacterieele stofwisseling zeer wel mogelijk is zich een beeld te vormen van harmonisch samengaande afbraak- en opbouwreacties, waarbij in het geheel genomen de vrije energie daalt, welke laatste dus aan de bacteriën ten goede kan komen. Hoewel in ons geval tot nu toe het feitenmateriaal ontbreekt, om tot een meer in bijzonderheden afdalende beschouwing der hier plaats hebbende reacties te treden, meenen wij toch de boven aangeduide voorstellingswijze als werkhypothese te mogen aanvaarden.

In dit verband is het ook van belang, dat in de proeven zonder acetaattoevoeging aan het substraat, respectievelijk bij afwezigheid van glucose, de vorming van toxine eenige uren eerder begon, dan bij de andere proeven het geval was. Dat bij de proeven met 1 % maltose ook een dergelijk eerder optreden van de toxinevorming op te merken viel, zal vermoedelijk tot oorzaak hebben de veel sterkere groei in de eerste 24 uur van de proef. De zeer vertraagde toxinevorming bij gebruik van Witte-pepton of pepton, bereid uit varkensmaag, zal wel te wijten zijn aan de geringere bruikbaarheid van deze peptonsoorten, zoowel in assimilatorisch als in dissimilatorisch opzicht.

In de gevallen, dat het toxine in behoorlijke concentratie gevormd wordt, blijkt de snelheid van dit proces vrijwel constant te zijn, totdat de maximumwaarde bereikt is, om op dit moment plotseling tot nul te dalen. Wat de oorzaak van dit min of meer abrupte ophouden der toxineproductie is, valt moeilijk te zeggen.

Dit verschijnsel kan zijn oorzaak vinden in het opraken van een voor de toxinevorming noodzakelijk bestanddeel, respectievelijk in het bereiken van een te hooge concentratie van een of ander stofwisselingsproduct. De absolute grootte der snelheid (te meten aan de steilheid der toxinecurven) is natuurlijk afhankelijk van diverse factoren, de stofwisseling betreffende.

Wat betreft de maximumwaarde van de toxine-concentraties in de diverse proeven bereikt, speelt de samenstelling van het milieu een zeer groote rol, zooals bij beschouwing van tabel 13 aanstonds opvalt. Uit den grooten invloed van het al of niet aanwezig zijn van acetaat in het medium blijkt wel, dat ook de ontleding van bepaalde koolstofverbindingen van groot belang voor de toxinevorming is.

Overzien wij het geheel der hier beschreven proeven en hun resultaten, benevens de daaraan vastgeknoopte theoretische beschouwingen, dan valt niet te ontkennen, dat deze laatste in hooge mate van speculatieven aard zijn. Er zal nog veel noodig zijn, alvorens al deze verschijnselen nader verklaard kunnen worden. In volgende verhandelingen hopen wij op een en ander nader terug te komen.

Samenvatting.

- 1e. Er werd een kort overzicht gegeven van de meest belangrijke onderzoekingen betreffende de stofwisseling van *C. Diphtheriae* in kunstmatige voedingsbodems, zulks in verband met het probleem van de toxinevorming in deze substraten. Naar aanleiding hiervan werd betoogd, dat slechts een diepgaand quantitatief stofwisselingsonderzoek in zoo eenvoudig mogelijk samengestelde voedingsmedia en *in samenhang met de vorming van diphtherietoxine*, dit vraagstuk nader tot zijn oplossing kan brengen.
- 2e. In een reeks proeven, waarvan de resultaten in verschillende tabellen en grafieken weergegeven zijn, werden nagegaan de snelheid der suikerontleding, verandering van de waterstofionenconcentratie en vorming van toxine en wel werden als suikers glucose en maltose gebruikt, terwijl als stikstofbron diverse peptonsoorten dienst deden.

- 3e. De diphtheriebacteriën zijn in staat om glucose tot een concentratie van 0,2 % zonder bezwaar voor de toxinevorming te verwerken. Voegt men meer glucose toe (0,5%) dan wordt deze hoeveelheid suiker wel ontleed, zij het dan ook in totaal langzamer dan de eerstgenoemde hoeveelheid, doch hierbij treedt een zoodanig sterke zuurvorming op, dat de productie van toxine hierdoor nagenoeg geheel belemmerd wordt. Maltose blijkt daarentegen tot een veel hogere concentratie verdragen te worden. De oorzaak van dit verschijnsel blijkt te liggen in het feit, dat de *ontledings-snelheid* van glucose onder inwerking van de diphtheriebacteriën ongeveer zesmaal grooter is dan de *vormings-snelheid* van glucose door hydrolyse van maltose.
- 4e. Bij de suikerontleding blijkt de pH eerst te dalen, om op het moment, dat de suiker (glucose) uit de oplossing verdwenen is, weer te stijgen, zulks waarschijnlijk tengevolge van de oxydatie der uit de glucose gevormde zuren tot basisch reagerende carbonaten.
- 5e. De vorming van het eigenlijke toxine begint op het moment, dat de suiker (glucose) nagenoeg uit de oplossing verdwenen is, verloopt gedurende een bepaalden tijd met nagenoeg constante snelheid, om dan plotseling op te houden. De A.W., gemeten met *Ramon's* uitvlokreactie, vermindert niet door langer bebroeden van de kweek. Over het mechanisme der toxinevorming werden eenige meer of minder speculatieve beschouwingen gegeven.

LITERATUUR :

- 1) *H. Braun*, Zentr. Bakt. I Abt. Origin. 93, 183 (1924).
- 2) *H. Braun* en *K. Hofmeier*, Klin. Wochenschrift 6, 699 (1927).
- 3) *H. Braun* en *F. Mündel*, Zentr. Bakt. I Abt. Origin. 112, 347 (1929).
- 4) *H. Braun*, *K. Hofmeier* en *F. Mündel*, Zentr. Bakt. I Abt. Origin. 113, 530 (1929).
- 5) *J. Nitsch*, Z. Kinderh. 54, 470 (1933).
- 383, 515 (1935); 30, 513, 525 (1935).
- 6) *J. H. Mueller*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 32, 318 (1935); J. Bact: 29,
- 7) *H. H. de Wolff*, Biochemische eigenschappen van de diphtherie en van de pseudo-diphtheriebacterie. Diss. Utrecht (1927).
- 8) *A. en G. Hottinger*, Z. Kinderh. 54, 440 (1933).
- 9) *A. Fujita* en *T. Kodama*, Biochem. Z. 271, 185 (1934).
- 10) *O. Ehrismann*, Zentr. Bakt. I Abt. Origin. 127, 111 (1933).

- ¹¹⁾ „Diphtheria”, Medical Research Council, His Maj. Stat. Office, London (1923).
 - ¹²⁾ *J. Tomcsik*, Zentr. Bakt. I Abt. Origin. 118, 36 (1930).
 - ¹³⁾ *A. W. Wadsworth* en *M. W. Wheeler*, J. Inf. Dis. 42, 179 (1928).
 - ¹⁴⁾ *C. G. Pope*, Brit. J. Exp. Pathol. 13, 207 (1932).
 - ¹⁵⁾ *A. Ström*, The Production of Diphtheria Toxin; State Inst. Public Health, Oslo (1935).
 - ¹⁶⁾ *N. Schoorl*, Chem. Weekblad 26, 130 (1929); Chem. Jaarb. der Ned. Chem. Ver. II, 109 (1930).
 - ¹⁷⁾ *F. B. Seibert*, J. Biol. Chem. 70, 265 (1926).
 - ¹⁸⁾ *A. Tasman* en *A. W. Pot*, Leeuwenhoek 1, 88, 179 (1934).
 - ¹⁹⁾ *Jan Smit*, Vom Wasser 2, 173 (1928).
 - ²⁰⁾ *G. Ramon*, Ann. Inst. Pasteur 21, 1001 (1923).
 - ²¹⁾ *A. J. Kluyver*, Biochemische suikerbepalingen, Diss. Delft (1914).
 - ²²⁾ *A. C. Brandwijk* en *A. Tasman*, Ned. Tijdschrift Hyg. Microbiol. en Serol. 7, 283 (1933); 8, 94 (1934); Leeuwenhoek 1, 38 (1934); Z. Immf. Exp. Ther. 77, 390 (1932); 78, 540 (1933); 81, 137 (1933).
 - ²³⁾ *A. J. Kluyver*, The Chemical Activities of Microorganisms, Univ. London Press. London (1931).
-

Over besmetting van fretten met het gorgelwater van griepatienten

DOOR

J. P. BIJL en J. DOMMISSE.

Toen zich in het voorjaar 1935 in Holland talrijke gevallen van griep voordeden, besloten wij na te gaan of bij de patiënten hetzelfde virus aanwezig was, als door Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw in Engeland is geïsoleerd.

Zooals bekend, hebben genoemde Engelsche onderzoekers gevonden, dat door intranasale besmetting van fretten met keel-spoelsel van griepatienten, deze dieren na ongeveer 2 dagen ziekteverschijnselen gaan vertoonen, zich uitende in koorts en neuscatarrh. Soms is alleen de neuscatarrh aanwezig. Het dier niest, een slijmig etterig exsudaat is aan de neusgaten te zien, de oogen zijn ontstoken.

Reeds dadelijk deed zich bij het onderzoek de vraag voor, wat de normale temperatuur van de fret is. Terwijl de Engelsche onderzoekers 39.7 nog normaal noemen, rekent Elkeles 38.7 als de grens. Wij hebben daarom bij een tiental normale fretten langen tijd 2 maal per dag de temperatuur opgenomen en zagen daarbij, dat deze slechts zeer zelden boven 39 komt en dan nog maar bij één enkele opname. In het algemeen schommelt de temperatuur tusschen 37.8 en 38.8. Een temperatuur, die langer dan één dag boven 39° is, moet o.i. als koorts worden aangemerkt. In hoeverre de Engelsche fretten tot een ander ras behooren of in hoeverre voeding en andere omstandigheden dit verschil tusschen onze waarnemingen en die der Engelsche onderzoekers kunnen verklaren, laten wij in het midden.

Het te onderzoeken materiaal werd verkregen door patiënten te laten gorgelen met physiologische keukenzoutoplossing.

Hiermede werden dan fretten besmet door de vloeistof in den neus te laten druppelen. Wij gebruikten dan zoowel normale fretten, als dieren, die kort te voren een infectie met het Engelse virus, afkomstig van Wilson Smith, hadden doorgemaakt. Ten einde onderlinge infectie te voorkomen, werden de dieren over verschillende kamertjes verspreid en door verschillende bedienden verzorgd.

Wij zijn in de gelegenheid geweest 3 reeksen van onderzoeken te verrichten.

1° Proefreeks.

Militairen uit het garnizoen te Leiden. (off. v. gez. Kuipers). Dit betrof steeds patiënten in het begin van de ziekte.

Patiënt V.

Fret 6 wordt 26 Maart besmet. Temperatuur 38. 29 Maart stijgt de temperatuur tot 39.6 en blijft 4 dagen boven 39, om dan te dalen en tusschen 37 en 38.5 te schommelen. Tijdens de koortsperiode niest het dier voortdurend, heeft een etterige neuscatarrh, maakt een zieken indruk, eet niet en ligt stil in zijn hok.

Deze fret wordt 9 Mei met Engelsch virus besmet. De temperatuur stijgt 5 dagen later, dus na een langen incubatietijd, één dag tot 39.4, om dan weer te dalen en 4 dagen later weer eenmaal 39.6 te zijn. Het dier is evenwel niet ziek daarbij en vertoont geen catarrhale verschijnselen. De temperatuur blijft dan verder beneden 38.7. De kortdurende temperatuursverhoogingen, de lange incubatietijd en het ontbreken van verdere verschijnselen pleiten tegen een griepinfectie.

Patiënt Z.

Fret 8 wordt 2 April besmet. De temperatuur stijgt 2 dagen later tot 39.2, om 6 April weer 38.7 te zijn. Het dier vertoont dezelfde klinische verschijnselen als de vorige fret: zwaar algemeen ziek zijn, neuscatarrh. Na het klinisch herstel blijft de temperatuur beneden 37.7.

Patiënt D.

Fret 9 wordt 2 en 3 April besmet. De temperatuur blijft steeds beneden 38.7. Het dier vertoont geen klinische verschijnselen.

Fret 9 wordt 9 Mei met Engelsch virus besmet. De temperatuur stijgt 2 dagen later tot 39.7 en is 12 Mei 41.5, om tot 20 Mei tusschen 39 en 40 te schommelen. Het dier is zwaar ziek met typisch klinische verschijnselen. Na door een andere fret op verscheidene plaatsen gebeten te zijn, sterft het dier 25 Mei.

Bij navraag aan den Chef van het Militair hospitaal te 's-Gravenhage, waarheen de patiënten geëvacueerd zijn geworden, wordt ons medegedeeld, dat de militairen V. en Z. aan griep geleden hebben, terwijl patiënt D. een bronchopneumonie zonder griepverschijnselen heeft doorgemaakt.

Samenvatting. 2 fretten, die nasaal besmet zijn met gorgelwater van twee grieppatiënten in het beginstadium der ziekte, vertoonen daarna lichte koorts met verdere typische klinische verschijnselen. Een der fretten is 6 weken later misschien niet geheel immuun tegen infectie met Engelsche virus.

Een fret geïnfecteerd met gorgelwater van een lijder aan broncho-pneumonie blijft gezond en vertoont 5 weken later, na infectie met Engelsche griepvirus, hooge koorts met typische catarrhale verschijnselen.

2° *Proefreeks.*

Volgens de courantenberichten kwamen in een inrichting te 's-Gravenhage ernstige griepgevallen voor, waarvan sommige zelfs doodelijk eindigden. Wij hebben ons toen in verbinding gesteld met Dr. J. M. Broekman, den aan die inrichting verbonden geneesheer, die ons mededeelde, dat 8 zusters ziek zijn geworden, 5 hadden een acute pneumonie gekregen, waaraan 3 patiënten gestorven zijn.

Hoewel de onderzoekingen van de Engelsche geleerden er op wijzen, dat het virus slechts in het begin der ziekte aanwezig is, hebben wij toch van 2 patiënten, die genezende waren, gorgelwater en sputum onderzocht.

Zuster A.

Fret 9 (na een vroegere proef gezond gebleven), wordt 30 April besmet. Het dier blijft gezond; de temperatuur komt niet boven 38.6. De fret is 10 dagen later niet immuun tegen Engelsch virus.

Fret 6 (tevorens ziek geweest na besmetting met gorgelwater van een grieppatiënt), wordt 30 April geïnfecteerd. Het dier blijft gezond. De temperatuur stijgt niet boven 38.7.

Zuster B.

Fret 11 wordt 30 April intranasaal besmet. Het dier blijft gezond. De temperatuur stijgt niet boven 38.2.

Fret 8 (3 weken tevoren ziek geweest na infectie met gorgelwater van een grieppatiënt), wordt 30 April besmet. De temperatuur stijgt niet boven 38.4. Geen klinische verschijnselen.

Samenvatting. In het gorgelwater van twee grieppatiënten met pneumonie kon na afloop van het acute stadium der ziekte geen griepvirus aangetoond worden.

3° *Proefreeks.*

Nadat wij vernomen hadden, dat in de schippersschool te

Vreeswijk in het internaat een ernstige griependemie heerschte, hebben wij ons met den Geneesheer aan dezen inrichting in verbinding gesteld. Dr. Buurman was zoo vriendelijk ons mede te deelen, dat de meeste der leerlingen door de ziekte waren aangetast geworden. De patiënten hadden hooge koorts en sommigen hadden in aansluiting aan de ziekte een pneumonie gekregen.

Gorgelwater C. V., 2de ziektedag.

Fret 15 wordt 24 Mei ingedruppeld. Het dier heeft 27 Mei 39.7 en een etterige neuscatarrh, die eenige dagen aanhoudt. De temperatuur blijft tot 1 Juni tusschen 38.6 en 39.9 schommelen, om daarna normaal te worden. Het dier maakt een zeer zieken indruk, eet niet, reageert niet als tegen de kooi geklopt wordt, enz.

Gorgelwater v. d. Z., 3de ziektedag.

Fret 16 wordt 24 Mei ingedruppeld. 28 Mei temperatuur 39.7 en blijft tot 3 Juni om de 40 schommelen. 29 Mei 40, 30 Mei daalt de temperatuur tot 39.2, om 31 Mei weer tot 40.1 te stijgen. Den volgende dag weer daling tot 39, om dan weer een stijging tot 40 te vertoonen. Daarna normaal. Het dier maakt een zeer zieken indruk met de typische catarrhale verschijnselen.

Ter contrôle wordt het gorgelwater van beide patiënten ingedruppeld bij fretten 6 en 13, die te voren een infectie met Engelsch virus hebben doorgemaakt. Beide dieren zijn gezond gebleven.

Samenvatting. Met het gorgelwater van 2 kinderen van de schippersschool te Vreeswijk, die sedert 2 respectievelijk 3 dagen aan griep lijdende waren, werden fretten besmet. Deze dieren vertoonden daarna de typische ziekteverschijnselen, terwijl fretten, die te voren een infectie met Engelsch virus hadden doorgemaakt, gezond zijn gebleven. Geconcludeerd mag worden, dat in het keelslijm van de 2 grieppatiënten griepvirus aanwezig was.

Gorgelwater H. P., 7de ziektedag.

Fret 19 werd 24 Mei geïnfecteerd. Het dier bleef gezond.

Gorgelwater L. P., 7de ziektedag.

Fret 20 werd 24 Mei geïnfecteerd. Het dier bleef gezond.

Samenvatting. In het gorgelwater van 2 kinderen op den 7den ziektedag van griep werd geen virus aangetoond.

Ten einde na te gaan of de smetstof van bacteriëelen aard was, werd het neussecreet van zieke fretten bacteriologisch onderzocht. Hierbij werd herhaaldelijk een micro-organisme ge-

gevonden, dat als streptococcus pleomorphus gediagnostiseerd werd. De coccus was bij subcutane inspuiting pathogen voor witte muizen. In de neusholte van fretten gebracht, gaf het geen aanleiding tot het ontstaan van ziekteverschijnselen.

Samenvatting. Bij 3 proefreeksen werden fretten intranasaal besmet met het gorgelwater van 8 grieppatiënten en van 1 lijder aan bronchopneumonie.

In het gorgelwater van den lijder aan bronchopneumonie werd geen virus aangetoond.

In het gorgelwater van 4 grieppatiënten, genomen op den 7den of lateren dag der ziekte, kon geen virus aangetoond worden.

Fretten geïnfecteerd met gorgelwater, genomen den 1sten, 2den of 3den ziektedag van grieppatiënten, vertoonden 2—3 dagen later typische ziekteverschijnselen, bestaande in algemeen ziek zijn, koorts en etterige neuscatarrh. De ziekteverschijnselen duurden ongeveer een week.

Fretten, die te voren besmet geweest waren met Engelsch virus, werden niet ziek. Fretten, die een infectie met Hollandsch virus hadden doorstaan, waren, behoudens één twijfelachtig geval, immuun voor Engelsch virus.

Conclusie. Bij grieppatiënten is in het begin der ziekte een smetstof in het keelslijm, die bij fretten typische ziekteverschijnselen doet ontstaan. De smetstof heeft immunologisch overeenkomst met het griepvirus van Wilson Smith, Laidlaw en Andrewes.

Uit diagnostisch oogpunt verdient het aanbeveling in bijzondere gevallen fretten te infecteeren.

Een verbeterde serologische pipet en over de druppelgrootte van verschillende vloeistoffen.

DOOR

Jonkvrouwe M. VAN RIEMSDIJK.

Wij leven tegenwoordig in een periode, waar het woord „efficiency” bovenaan staat. Men merkt dit sterk aan de jongere generatie: snel arbeiden, als het kan met een techniek, die zoo ongecompliceerd mogelijk is.

Daarbij komt stellig de factor bezuiniging, die hier een ernstig woord medespreekt, en die maakt, dat de overblijvende arbeidskrachten vaak dubbel werk moeten verrichten; kortom, snel arbeiden, snel aflezen, is het parool van den dag.

De door mij destijds geconstrueerde serologische Pipet, zie Ned. Tijd. v. Geneesk.¹⁾ en Central. bl. für Bakter.²⁾, waarmede met „deeltjes” wordt gewerkt en welke zeer eenvoudig zelf is te vervaardigen (fig. 1 en 2), heeft een arbeidsvereenvoudiging en daarmede een arbeidsversnelling ondergaan, die ik hier kort wil aangeven, en die maken, dat het instrumentje tegemoet komt aan den snellen polsslag van dezen tegenwoordigen tijd.

Zooals de serologische pipet tot nu toe was, arbeidde deze geheel door eigen kracht, ik wil daarmede zeggen, dat noch persen, noch zuigen hier noodig was, het een zuiver „inhevelen” der vloeistof betrof, gebaseerd op de capillairiteit en de wet der communiceerende vaten.

Al was deze techniek gemakkelijk en met eenige handigheid snel te leeren, er werd toch een zekere vaardigheid voor vereischt; een fijnere manipulatie eischt nu eenmaal meer tijd.

¹⁾ Ned. Tijd. v. Geneesk., 1ste Helft, no. 8, 1917.

²⁾ Central bl f. Bakter., 1ste Abt., orig. Bd. 91, Hft. 2, 1923.

Er wordt in de Serologie veel „gedruppeld”, dit gaat inderdaad zeer snel, of het nauwkeurig is, is zeker een tweede vraag.

Reeds vroeger heb ik hierop gewezen en het is wellicht nuttig het vraagstuk van het „druppelen” hier eens nader te bezien.



Fig. 1. Serum-pipet.



Fig. 2. Suspensie-pipet.

In de pharmacie is er niet voor niets een *internationale druppelteller* (Lebaique), juist voor het groote verschil in druppelgrootte van verschillende vloeistoffen.

In de Pharmacopee is er zelfs een geheele tabel aan gewijd.

De grootte van den druppel, die uitvloeit uit een nauwe buismond, staat in direct verband tot de volgende factoren:

- a. = Aard der vloeistof (viscositeit; soort. gew.; oppervlakte-spanning, enz.).
- b. = Snelheid van het druppelen.
- c. = Rechte of schuine stand der pipet.
- d. = Hoogte van vloeistofkolom in de pipet.
- e. = Lengte uitvloeibuis (bij Pasteur'sche pipetten is die dan eens langer, dan weer korter).

Dat dit geen zuiver theoretische beschouwing is, moge onderstaand klein proefje verduidelijken.

Ik nam 2 Pasteur'sche druppelpipetten, de een wat dunner, de ander wat dikker. Zij werden voorzien van een zg. caoutchouc „speentje”, voor het opzuigen van de vloeistof, zooals te doen gebruikelijk is.

Met deze pipetten werden tot volle capaciteit van het speentje telkens verschillende vloeistoffen opgezogen, en in „rechten” stand der pipet en zooveel mogelijk met constante druppelsnelheid uitgedruppeld in één zelfde maatglaasje en gezien het aantal druppels per ccm. Het maatglaasje werd telkens tusschen iedere proef uitgedroogd. Tot drie keer toe moesten de uitkomsten van éénzelfde bepaling gelijkloidend zijn, voordat deze werden opgeteekend.

Dezelfde proef werd telkens herhaald, doch werd nu de

vloeistof tot halve pipethoogte opgezogen, tot een constant merkteeken. Zie hier de resultaten in Tabel I en II neergelegd.

TABEL I. Dunne Pasteur'sche Pipet.

„Maximale" hoogte vloeistofkolom		„Halve" hoogte vloeistofkolom	
Rechte stand Pipet	Schuine stand Pipet (hoek $\pm 45^\circ$)	Rechte stand Pipet	
Water	30 druppels per ccm.	Water	34 druppels per ccm.
Bouillon	38 " "	Bouillon	41 " "
Zoutsolutie (physiologisch)	31 " "	Zoutsolutie (physiologisch)	34 " "
Peptonwater	37 " "	Peptonwater	40 " "
Fickers Diagnos- ticum	40 " "		
Alcohol 96 %	80 " "	Alcohol 96 %	88 " "
Kahn's Luetisch Extr. gecholester.	62 " "	Kahn's Luetisch Extr. gecholester.	65 " "
Bacillen suspensie (levend)	32 " "	Bacillen suspensie (levend)	34 " "
Schapenserum	35 " "	Schapenserum	37 " "
Menschenserum	32 " "	Menschenserum	33 " "

TABEL II. Dikkere Pasteur'sche Pipet.

„Maximale" hoogte vloeistofkolom		„Halve" hoogte vloeistofkolom	
Rechte stand Pipet.	Schuine stand Pipet (hoek $\pm 45^\circ$)	Rechte stand Pipet	
Water	24 druppels per ccm.	Water	26 druppels per ccm.
Bouillon	30 „ „ „ „	Bouillon	33 „ „ „ „
Zoutsolutie (physiologisch)	26 „ „ „ „	Zoutsolutie (physiologisch)	27 „ „ „ „
Peptonwater	32 „ „ „ „	Peptonwater	33 „ „ „ „
Fickers Diagnos- ticum	32 „ „ „ „		
Alcohol 96 %	57 „ „ „ „	Alcohol 96 %	61 „ „ „ „
Kahn's Luetisch Extr. gecholester.	44 „ „ „ „	Kahn's Luetisch Extr. gecholester.	48 „ „ „ „
Bacillensuspensie (levend)	27 „ „ „ „	Bacillen suspensie (levend)	27 „ „ „ „
Schapenserum	27 „ „ „ „	Schapenserum	29 „ „ „ „
Menschenserum I	26 „ „ „ „	Menschenserum I	26 „ „ „ „

Deze staatjes spreken voor zichzelf en een ieder oordeele.
Men heeft dus een sprong van niet minder dan 9 druppels per

1 ccm tusschen Phys. zoutoplossing en Ficker's Diagnosticum, een voorbeeld uit de dagelijksche praktijk (reactie van Widal).

Het zijn wederom precies dezelfde verhoudingen, die ik jaren geleden reeds aantrof en in mijn aantekeningen terugvond.

Wij zien verder, dat water den grootsten druppel geeft, dan volgt phys. NaCl-oplossing, waarin èèn vreemde stof is gesuspendeerd en naarmate dit toeneemt, m.a.w. de vloeistoffen samengestelder worden, worden de druppels „kleiner”. (Alcohol staat daarbuiten).

Het groote gevaar van de pipet „schuin” te houden, blijkt ook uit deze proeven; dit geeft een verschil van 7 druppels; door het schuin houden, worden deze aanmerkelijk grooter.

Verder zien wij, dat de hoogte van de vloeistofkolom in de pipet ook een rol speelt, om van het snellere of minder snelle druppelen nog niet eens te spreken, hetgeen ook verschil geeft.

Of deze fouten veronachtzaamd mogen worden? Men hoort wel eens beweren, dat het er voor een agglutinatie minder op aan komt, men in ieder buisje dezelfde fout maakt. Nauwkeurig is het echter geenszins, en voor een Reactie van Wassermann of die van Kahn of andere colloïdale uitvlokkingsreacties, waar alcohol in het spel is, moge men zich toch wel hoeden.

Daarbij komt nog een factor, die ik niet gaarne zou willen nagaan, n.l. hoe dikwijls men zich bij het „tellen” der druppels vergist, dit is onvermijdelijk en eischt voortdurend concentratie.

Als het niet anders *kan*, moet men zich bij al deze fouten neerleggen, doch het *kan* heel gemakkelijk anders.

Het arbeiden met „deeltjes” (volume-eenheden), die volkomen aan elkaar gelijk zijn, en die men nauwkeurig in- en uit laat loopen, ondervangen grootendeels al deze fouten.

De constructie van bovengenoemde pipet is werkelijk doodeenvoudig en alles wat men noodig heeft, is glasbuis van 5 mm diameter uitwendig.

Men zie voor de nauwkeurige beschrijving de reeds aangehaalde artikelen, doch in hoofdtrekken wil ik die hier herhalen:

- a. Glasbuis, diam. uitwendig 5 mm. en daarvan 15 cm. lengte.
- b. „Mat” maken door langs strijken met z.g. „Gamburger's puimsteentje” bij iederen drogist of in bazar te krijgen (is eigenlijk zandsteen).
- c. Langs cm. maat pipet gradueeren, door met gewoon hard potlood op iedere cm. afstand streepje te zetten, tot 11 streepjes toe (de deeltjes zijn inderdaad *volkomen* aan elkaar gelijk, zie 1).

d. Stukje zuigslang $4\frac{1}{2}$ cm. lang, diam. 4×13 (z.g. gewikkelde zuigslang), dat de pipet luchtdicht omklemt.

e. De „suspensie”-pipetten maakt men 25 cm. lang en geeft alleen bij 1 en 10 een teeken.

Deze worden in hetzelfde caoutchouc geklemd (Fig. 2).

Nu is een besliste verbetering, die het uitloopen der deeltjes zuiverder maakt (minder adhaesie der vloeistof), door het „eerste” deeltje van de pipet heel weinig puntig uit te trekken. Men bepale zich hierbij uitsluitend tot het *uiteinde* van dit eerste deeltje, opdat het lumen van het tweede deeltje volkomen on-aangetast blijft. Dit lijkt wellicht moeilijk, het is echter zeer gemakkelijk, als men zich bedient van een *zeer kleine* vlam, een gewone Bunsenbrander op zijn laagst gedraaid en daarvan de bovenste punt kan daarvoor zeer goed dienst doen.

De suspensie-pipetten behandelt men eveneens, men zorge hier dat de monding tamelijk wijd blijft ± 1 mm (zie fig. 5), om de bacillensuspensie snel te doen afvloeien.

Voor de gewone agglutinatie (totaal vloeistofvolume ± 1 ccm) is de pipet van 5 mm diameter het beste. Wil men echter met kleinere vloeistofquantiteiten arbeiden, zoo neme men glasbuis 4 mm — 3 mm — 2 mm, naar verkiezing.

Het spreekt wel vanzelf, dat men tenslotte de kalibreering maken kan, zooals men wil. Voor de reactie van Sachs-Georgi zal men b.v. de pipet langer moeten maken, 20 deeltjes aanbrengen en deze weer onderverdeelen.

Hiermede is de geheele pipet voltooid; eenvoudiger kan het haast niet.

De reiniging is zeer gemakkelijk, door de pipet uit het caoutchouc te trekken en onder de kraan door te spoelen en uit te blazen.

Wil men de pipet in het zuigapparaat laten (zie onder), zoo spoele men, door telkens opnieuw water op te zuigen en weer uit te persen. De laatste vloeistofdeeltjes, die vanzelfsprekend in de uiterste pipetmonding achterblijven, laat men op filtreerpapier afloopen.

Men beware de losse pipetten het beste in buis met alcohol, goed opgesloten.

Nu kan deze pipet haast even snel arbeiden als het beroemde „druppelen” door deze eenvoudig te klemmen in de z.g. „op-

zuiginrichting voor pipetten", oorspronkelijk afkomstig uit het Centraal Laboratorium (Ali Cohen-Broers), doch gewijzigd.

Ook dit toestelletje kan men *zeer gemakkelijk* zelve maken. Zie Fig. 3—4—5.

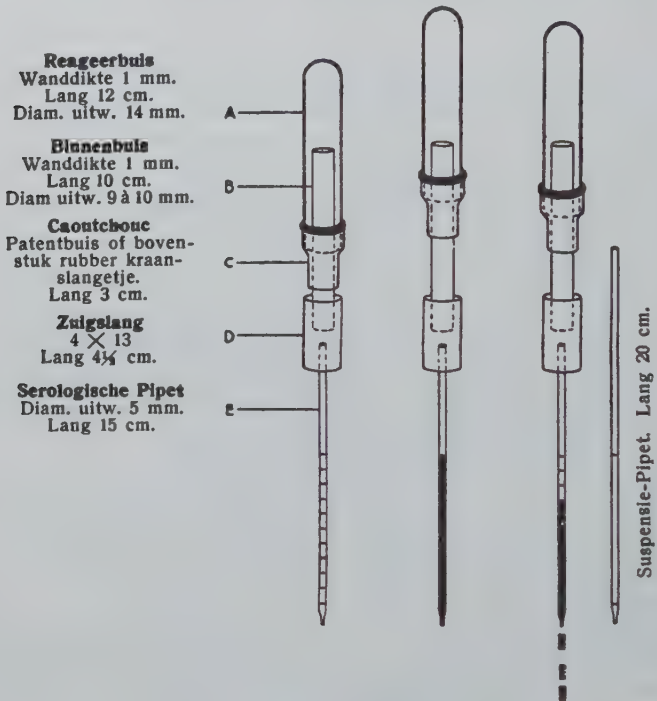


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

Het is een buizenstel, dat in elkaar schuift en van de lucht wordt afgesloten door een goedsluitend caoutchouc.

Het principe van de werking van dit zuigapparaat ligt voor de hand; door buis A omhoog te trekken, zuigt men de vloeistof zeer gemakkelijk omhoog en wel met één hand. Men houdt daartoe de pipet *vertikaal* met de vingers van den rechterhand omklemd om beide caoutchoucstukken, die daar een zeer aangename steun ondervinden; leg duim en wijsvinger om den bovensten caoutchoucrand van C en nu schuift men met genoemde vingers buis A met het caoutchouc op en neer. (Fig. 4—5).

Dit manoeuvreeren gaat werkelijk zeer gemakkelijk en hangt geheel af van de soepelheid van slangstuk C, dat op en neer

moet schuiven en toch luchtdicht de buizen moet blijven omklemmen.³⁾

Men neemt voor dit slangstuk òf z.g. „patentbuis” (handelsnaam) òf ook *zeer goed* het bovenstuk van een eenvoudig rubber *kraanslangetje* (met straalbreker, in iederen huishoudwinkel verkrijgbaar). Hieraan zit van boven een verdikte ring, die buitengewoon gemakkelijk is voor het op en neer schuiven. Het vooraf bevochtigen van buis B (druppel water of fractie Paraff. Liquid.) vergemakkelijkt de glijdbaarheid. De diameter van buis B moet men kiezen naar gelang van de wijdde van het slangstuk C, zal varieeren tusschen 9 à 10 mm.

De opening van pipetzuigslang (D), die om B moet klemmen, zal men een weinig moeten opboren (kurkboor in alcohol), omdat B zooveel wijder is dan de pipet.

Men controleere de volkomen afsluiting der caoutchouken, door in de pipet water op te zuigen tot bovenaan, daarna het toestel vertikaal in de hand houden. Er mag dan niet alleen geen vloeistof afloopen, maar zelfs aan de uitmonding geen spoor van druppelvorming zich vertoonen; eerst dan kan de pipet zuiver functionneeren.

Men ziet dus, dat men dit geheele toestelletje zeer eenvoudig en met heel weinig kosten zelve kan fabriceeren. Opzuigen en uitloopen der afzonderlijke deeltjes gaat wel zeer gemakkelijk en zeer vlug. Men late hier de deeltjes tegen den buiswand of nog liever tegen den bodem *recht* uitloopen, „vrij” druppelen kan hier niet, als volgt:

„*Uitloopen*” der *deeltjes*: Plaats pipet met punt op bodem van buisje.

„*Uitloopen*” *deeltjes als er reeds vloeistof in buisje is*: Alleen *punt* van pipet *recht* in vloeistof houden en deeltje laten afloopen.

„*Inloopen*” *deeltjes uit vol buisje*: Pipet tegen achterwand buisje laten steunen, alleen *punt* in vloeistof brengen en opzuigen.

Voor de pipetten met *dunner* lumen late men de deeltjes tegen den buiswand afloopen, en niet in de vloeistof, vanwege de grootere capillairiteit.

De bacillensuspensies make men bij voorkeur in kortere,

³⁾ In den handel bij Firma Marius te Utrecht, met opgaaf van maten.

wijdere reageerbuisen, diameter 17 mm, lengte 12 cm.; dit is het gemakkelijkst voor de suspensie-pipet, die dan minder diep in de reageerbuis hoeft gebracht te worden; tot den laatsten druppel kan men hier opzuigen.

Ook het laten afloopen der „deeltjes” op *vlakken* bodem (objectglas-blokschaaltjes), zooals b.v. bij de blokschaaltjes-agglutinaties voor *Leptospiren*⁴⁾), gaat zeer goed.

Men gevoelt wel, dat hier steeds dezelfde *volume-eenheid* wordt ingebracht, of men met lichtere of zwaardere vloeistoffen werkt, dit doet niets ter zake. Bij veel arbeid ook minder vergissingen, waar er niet meer „geteld” wordt, men hier altijd weet, waar men gebleven is.

Ik geloof, dat deze pipet zich geheel heeft aangepast aan het snelheidstempo van dezen tegenwoordigen tijd, zonder de onnauwkeurigheden.

Een ander voordeel meen ik nog naar voren te moeten

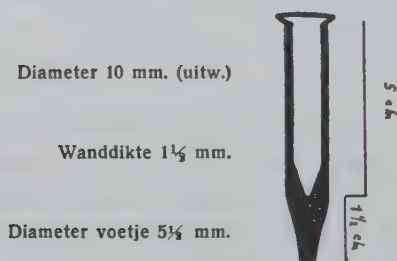


Fig. 6. Agglutinaties-buisje (doorsnede).

brengen; heeft men b.v. zeer weinig uitgangsmateriaal (serum), zoo behoeft men nooit in de moeite te zitten, door de berekeningen anders te maken, wat bij „meetpipetten” altijd het geval is. Men neemt of een pipet van nauwer lumen of men plaatst de „deeltjes” dichter op elkaar, b.v. op een $\frac{1}{2}$ cm afstand.

De berekening der serumverduunningen blijft altoos gelijk, men blijft altoos door 10 deelen. Voor het berekenen der serumverduunningen zie men ook het oorspronkelijk artikel, dit is steeds 10-deelig en zeer eenvoudig.

De fijn verdeelde meet-pipetten (1 ccm in 10 en 100, in den handel) laten zich ook gemakkelijk in slangstuk D klemmen.

⁴⁾ Postmus en Schultsz, Ned. Tijd v. Geneesk., 1ste Helft, no. 3, 1932.

Tenslotte nog een enkel woord over het *zuiver-aflezen* der uitvlokkingsreacties. Ik mag hier nog eens herinneren aan de de door mij voorgestelde Serologische reactiebuisjes ⁵⁾, waarin de „uitvlokking” wordt vergroot (Fig. 6) en die wel een *zeer fraai*, nooit dubieus beeld geven, geklemd in rekjes van kurk of in andere rekjes, zoo men wil.

Prof. Dr. P. Zeeman, onze wereldvermaarde physicus, was destijds zoo vriendelijk de optische eigenschappen dezer dikwandige buisjes na te gaan en te verklaren, dat de dikke glaswand inderdaad werkt als een *cylinderlens*, waardoor een beeld ontstaat met verlenging in den horizontalen meridiaan, waardoor de vlokken worden vergroot. Door het massieve „voetje” verdwijnt de hinderlijke lichtbreking, die altoos bij den *ronden* bodem der gewone agglutinatie-buisjes ontstaat, zoodat het beeld mede door het wegvallen van deze hinderlijke reflexen bijzonder *scherp*, *kleurecht* en *helder* te voorschijn komt.

Ook voor kleurreacties, van welken aard ook, zijn deze buisjes *zeer fraai*.

Deze buisjes, welke uit *één stuk glasbuis* worden getrokken, zijn in den aanschaf wel iets duurder, doch dit wordt wederom gecompenseerd door de *veel geringere* breekbaarheid.

Waar tegenwoordig de agglutinatie-reactie zeer gecompliceerd geworden is, met O en H suspensies, *grofvlokkig* en *tienvlokkig*, mag zeker aan de aflezing de uiterste zorg worden besteed.

⁵⁾ Ned. Tijd. v. Geneesk., 2de Helft, No. 13, 1923.

Centr. bl. für Bakter., Abt I, orig. Bd. 91, Hft. 2, 1923.

Boekaankondiging.

Zweite Internationale Kropfkonferenz in Bern 10—12 Aug. '33. Verhandlungsbericht herausgegeben im Auftrag der Schweiz. Kropfkommission von Dr. Otto Stiner. 1935. Verlag Hans Huber, Bern. Prijs Schw. fr. 25.—.

Dit boekwerk van 698 bladzijden, voorzien van vele grafieken, tabellen en foto's, is als een waardevolle aanwinst van de literatuur over krop te beschouwen. Bekende kenners van het struma-probleem uit bijna de heele wereld hebben belangrijke bijdragen geleverd. Uit ons land is er van de hand van Prof. R. de Josselin de Jong, een uitvoerige verhandeling in verschenen over: Die pathologische Anatomie der Struma bei Hyperthyreose resp. Morbus Graves-Basedow (blz. 1—62). Verder heeft Prof. de Josselin de Jong nog een studie over den invloed van jodiumtoediening op zwangere ratten geleverd. Van de buitenlandsche geleerden mogen genoemd worden Prof. J. Holst (Oslo), die over de pathologische anatomie van andere organen dan de schildklier schreef, Prof. H. Eppinger (Weenen), die de inwendige kliniek der ziekte van Basedow behandelde en Prof. L. Bérard en Dr. R. Peycelon, die over de chirurgische kliniek der hyperthyreoses refereerden. Verder zijn nog verschillende mededeelingen opgenomen (Roussy, Rössle, Orsós, Wegelin, de Quervain, Huguenin, e.a.).

Uiteraard is voor de lezers van „Leeuwenhoek” het gedeelte, dat handelt over de aetiologie het meest belangwekkend. Hier vindt men uitvoerige samenvattende en critische overzichten van mannen als McCarrison (Coonoor) en Pighini (Reggio Emilia) en interessante mededeelingen van Höjer (Malmö), Webster (New-York) en Eggenberger (Herisau), terwijl van vele andere onderzoekers, uit ons land van Dr. J. F. Reith (Rijks Instituut v. d. Volksgezondheid) en van Dr. Eerland uit Indië, een verslag is opgenomen van het door hen in de discussie medegedeelde.

Uit verschillende artikelen blijkt, dat sommige onderzoekers overtuigd zijn van de deficientie der jodiumdeficientietheorie. Aan de beteekenis van jodiumgebrek voor het ontstaan van krop wordt niet getwijfeld, maar daarnaast spelen nog andere factoren een groote rol.

Mac, Carrison, die zeer uitvoerige statistische berekeningen gemaakt heeft over den groei van de schildklier, noemt vier oorzaken voor krop, afgescheiden van bijzondere invloeden als erfelijkheid, puberteit, zwangerschap. De rol, die bacteriën zouden kunnen spelen, wordt natuurlijk niet over het hoofd gezien. In de eerste plaats noemt hij een vermeerderde behoefte van het lichaam aan de producten van de schildklier b.v. door overmaat van bepaalde stoffen in het voedsel. In de tweede plaats gebrekkige voeding van

de klier, b.v. door onvoldoende eiwit of vitamines in het diët, waardoor haar functie verminderd wordt en zij gevoeliger wordt voor toxische en microbiële invloeden. In de derde plaats de werking van toxische stoffen op de klier (chemische vergiften, bacteriële vergiften, b.v. afkomstig uit de darmen). In de vierde plaats noemt McCarrison gebrek aan bepaalde voedselbestanddeelen, zooals sommige vitamines, hexuronzuur, jodium, phosphaten en zekere „antikropstoffen”.

Deze verschillende oorzaken kunnen samen werken; soms zal de eene, soms de andere oorzaak belangrijker zijn. McCarrison wijst er op, dat thans geen theoretische beschouwingen meer noodig zijn, om het ontstaan van krop te verklaren, maar dat bewezen feiten in de plaats van beschouwingen zijn gekomen.

De beteekenis, die een vermeerderde behoefte aan producten van de schildklier heeft voor het optreden van krop, blijkt duidelijk uit de mededeelingen van Webster over proeven genomen in samenwerking met Marine. Bij hun proeven op konijnen bleek, dat deze dieren door voeding met een bepaalde koolsoort krop kregen. Als stof, die daarvoor aansprakelijk gesteld moet worden, werd een cyanide gevonden. Aangezien cyanide de weefseloxydatie verlaagt, vraagt het lichaam dan een stof, die de oxydatie weer verhoogt, n.l. het product van de schildklier. Hierdoor zou dan een relatieve jodium-insufficiëntie kunnen ontstaan. De beteekenis van „algemeene hygiënische omstandigheden” wordt hierdoor duidelijk en exact aangetoond.

Pighini deelt mede, dat verschillende stoffen calcium, fluor, organische zuren, fenkel enz., in staat zijn de schildklier functioneel te prikkelen en struma te doen ontstaan. Is de prikkel zeer sterk, dan ontstaan degeneratieve vormen. Het jodium werkt neutraliseerend op de genoemde stoffen. Pighini denkt aan de mogelijkheid, dat ook stralen de schildklier kunnen prikkelen. Niet het jodiumgebrek als zoodanig zou dus de oorzaak van krop zijn, maar wel bepaalde kropverwekkende agentia, die honger van het organisme naar jodium- of jodiumhoudende schildklierhormoon veroorzaken. De krop verwekkende agentia zouden volgens Pighini plaatselijk verschillen en vooral in het drinkwater voorkomen.

De beteekenis der experimenteele waarnemingen wordt door Höjer bij zijn onderzoek over krop in Zweden aan de praktijk getoetst. Hij vond, dat de zeer onregelmatige verspreiding van de kropgebieden in Zweden samen valt met bepaalde topografische gebieden. De krop komt voor in de diepe dalen, niet in hooge woudplateaux. Zeer uitvoerig beschrijft hij de kropgebieden in verband met de topografische ligging en komt dan tot de slotsom, dat gezocht moet worden naar een bepaalde positieve factor, die gebonden is aan topografie en aan het lokale klimaat. Aan de door McCarrison en Pighini op grond van hun experimenten genoemde factoren, hecht hij bij de natuurlijke verhoudingen geen groote beteekenis.

Zooals te begrijpen is, verdedigt Eggenberger de jodiumdeficientietheorie. Hij wijst er op, dat thyroxin voor 66 % uit jodium bestaat en dat het volwassen lichaam dagelijks ongeveer 100 tot 300 γ . thyroxin verbruikt. Wanneer de natuurlijke dagelijksche jodiumopname blijvend beneden 100 γ per kg. lichaamsgewicht daalt, ontstaat, onafhankelijk van andere omstandigheden, gevaar voor krop. Door de toediening van Vollsatz gingen in het

kanton Appenzell de bestaande parenchynateuze struma's terug, terwijl geen nieuwe ontstonden.

Ook Eerland verdedigt op grond van zijn onderzoekingen op Java de jodiumtheorie, hoewel hij naast jodiumgebrek ook andere factoren aanneemt. Hij bepleit de toediening van Vollsatz in endemische kropgebieden als Kediri. Het drinkwater speelt een rol bij het ontstaan van krop: de inlandsche bevolking kent bepaalde kropbronnen.

Reith komt op tegen de door sommigen verdedigde meening, dat in het bijzonder regelmatige toevoer van anorganisch gebonden jodium toxisch zou werken. Het water toch van de kropvrije gebieden in Holland bevat veel anorganisch gebonden jodium. Juist dit anorganisch gebonden jodium werkt wellicht gunstiger dan organisch gebonden. In sommige streken toch (Veitestranden in Noorwegen b.v.), waar organisch gebonden jodium in het water voorkomt, heerscht wèl endemische krop.

Uit deze korte mededeelingen uit het omvangrijke werk moge blijken, dat de tweede internationale kropconferentie zeer belangrijk heeft bijgedragen tot de bestudeering van het kropprobleem, en dat het uitvoerige en voortreffelijk uitgevoerde verslag als een belangrijke aanwinst der strumaliteratuur is te beschouwen.

J. P. BIJL.



Professor Dr. D. A. de Jong-Stichting.

Verslag over de verrichtingen en den toestand over het jaar 1935.

Zooals reeds eerder is medegedeeld, lag het in de bedoeling der beheerders om een onderzoek te doen instellen naar den z.g. „filtreerbaren vorm” van den tuberkelbacil.

Met dit onderzoek, dat door Dr. Schlemper in het laboratorium van Prof. De Graaff te Utrecht wordt verricht, werd in het verslagjaar een aanvang gemaakt en is dit thans zoover gevorderd, dat hierover waarschijnlijk dit najaar een voorloopige mededeeling zal kunnen plaats hebben.

De van verschillende vereenigingen en personen ontvangen geldelijke steun was ongeveer gelijk aan dien van het vorige verslagjaar; de bijdrage der Maatschappij voor Diergeneeskunde bleef, evenals in 1934, bepaald op 600.— gulden. Door het koersverlies op effecten ging het kapitaal der Stichting achteruit met f 879.05, waarna het totaalbezit op 31 December 1935 bedroeg f 16572.29.

Dr. Dhont, die met 1 Januari 1936 aan de beurt van aftreding was, werd herbenoemd, zoodat in het college van beheerders geen wijziging plaats had. Dit bestaat ook voor het loopende jaar uit de Heeren: Dr. J. J. F. Dhont, voorzitter, Prof. Dr. W. C. de Graaff, Prof. Dr. R. de Josselin de Jong, Prof. C. F. van Oyen en Dr. H. J. van Nederveen, secretarispenningsmeester (adres: Neuhuyskade 61, postrekening 105194, 's-Gravenhage).

De secretaris

H. J. VAN NEDERVEEN.

's-Gravenhage, Juli 1936.

Eendensalmonellose en hare beteekenis voor den mensch.

DOOR

Dr. JAC. JANSSEN.

HOOFDSTUK I.

Inleiding:

Salmonellose der eenden is een ziekte van groote beteekenis; op eendenfarms kan dit lijden belangrijke schade veroorzaken door: *a.* het sterven der embryo's tijdens de bebroeding, *b.* acute eendenkuikenssterfte direct of kort na het uitkomen, *c.* acuut ziek worden van jonge eenden, met meestal doodelijk verloop, *d.* chronisch smetstofdrager worden van volwassen eenden wat gepaard kan gaan met chronisch ziek zijn en ten slotte sterven. Bovendien is deze eendenziekte ook voor den mensch als *oorzaak van voedselvergiftigingen* van beteekenis; *zeer vele gevallen van salmonellose na het gebruik van eendeneieren zijn reeds beschreven.*

Men kent bij de eend de volgende soorten en variëteiten van *Salmonella*:

1. *Salmonella anatum*, die in Europa echter nog niet bij eenden is aangetoond.
2. *S. enteritidis* var. *dublin*, die wel, n.l. één maal, bij eenden gevonden werd, doch bij deze vogelsoort toch zelden schijnt voor te komen.
3. *S. typhi-murium*, die dikwijls bij eenden voorkomt (ook bij den mensch en zeer veel diersoorten).
4. *S. enteritidis* var. *essen*, die zonder twijfel eveneens veel bij eenden voorkomt en een *Salmonella* schijnt te zijn, die in het bijzonder bij de eend thuis hoort.

In Europa zijn het dus practisch *S. typhi-murium* en *S. enteritidis* var. *essen*, die voor de eend van beteekenis zijn en tevens ook voor den mensch, want beide zijn mensopathoog; deze beide *Salmonella*'s werden door mij in ons land bij eenden aangetoond en beschreven.

HOOFDSTUK II.

LITERATUUR:

Teneinde een beeld te geven van den arbeid, die op dit gebied reeds verricht werd, moge eenige literatuur genoemd worden. Deze literatuurvermelding heeft niet de pretentie geheel volledig te willen zijn, doch heeft ten doel de beteekenis en de reeds verkregen kennis van deze eendenziekte en haar gevaar voor den mensch in het licht te stellen. Om beknopt te blijven, zijn alleen zeer in het kort de voornaamste bevindingen van de belangrijkste mededeelingen vermeld. Een der eerste publicaties is van *Manninger* (48), die in 1918 sterfte van jonge eenden en ganzen vermeldt, waarbij als oorzaak genoemd wordt een „*paratyphus B*” bacil.

Men bedenke hierbij, dat toen de systematiek en determinatie nog niet zoo ver gevorderd was als thans; vermoedelijk is het een *S. typhi-murium* infectie geweest. Even later, wederom in 1918, verschijnt een tweede soortgelijke mededeeling van *Manninger* (49) over sterfte bij eenden- en ganzenkuikens van 1 à 2 weken oud, ook nu weer werden „*paratyphus B*” bacillen (waarschijnlijk *S. typhi-murium*) gekweekt. In 1920 verschijnt een belangrijke publicatie van *Rettger en Scoville* (58) over de zgn. „Keel”-ziekte bij eendenkuikens (to keel = omtuimelen; de zieke diertjes sterven acuut, waarbij zij dan typisch omvallen). Een *Salmonella* werd gekweekt uit de inwendige organen van de jong gestorven kuikentjes en ook uit het ovarium van oude eenden. Agglutinaties werden verricht met serum van „*b. typhosis*, *b. paratyphosus A*, *b. paratyphosus B* en *b. pullorum*.”

Het resultaat was, dat de bacil iets verwant zou zijn aan „*b. paratyphosus B*.” Deze *salmonellose* is dus een ziekte, die te vergelijken is met *morbus pullorum*, dit is een *salmonellose* bij de kip, veroorzaakt door een onbewegelijke *Salmonella* nl. *S. pullorum*, die als agglutinoogene formule heeft IX, XIII. Bij *morbus pullorum* ziet men eveneens kuikenssterfte en bij oude dieren oöphoritis (eierstokontsteking). De bacil van *Rettger en Scoville* werd door hen „*b. anatum*” genoemd, deze wordt thans genoemd *S. anatum* en heeft als agglutinoogene formule X, III : $e, h : 1, 4, 6$. De publicatie van *Rettger en Scoville* deed reeds sterk vermoeden, dat eendeneieren met *Salmonella* besmet kunnen zijn. Latere onderzoekers hebben dit met zekerheid aangetoond, *Rettger en Scoville* toonden *S. anatum* aan in het ovarium. Reeds nu zij opgemerkt, dat *Warrack en Dalling* in 1933 (73) eendenkuikenssterfte beschrijven door *S. aertrijcke* (= *S. typhi-murium*) en *S. enteritidis* Gaertner (= vermoedelijk *S. enteritidis* var. *essen*) en de bacillen uit de eieren konden kweken; *Schaaf* (60, 61 en 62) vermeldt het voorkomen van *b. enteritidis* *Brestau* (= *S. typhi-murium*) in de niet geresorbeerde dooierresten van ge-

storven eendenkuikens. Het is *Schaaf* gelukt, eenden te besmetten en uit de eieren en uit het ovarium (chronische oöphoritis) en uit de testikels *Salmonella* terug te kweken. Alles dus geheel overeenkomstig met *morbus pullorum* van de kip.

Spiegl und Lerche (68) noemen in 1924 salmonellose bij ganzen en eenden, waarbij „*Bact. enteritidis Breslau*” (= *S. typhi-murium*) gekweekt werd.

In 1927 wordt eendensalmonellose (volgens *Schaaf*) vermeld door *Ehrlich* (17). In dit zelfde jaar beschrijft *Doyle* (16) sterfte onder kippenkuikens en eendjes door „*B. aertrijcke*” (= *S. typhi-murium*). Ook hij schenkt aandacht aan de besmetting van het ei; wat de infectie van het ei van buiten af betreft merkt hij op, aan de hand van gegevens uit de literatuur, dat een ei bedekt is door een gelatineus laagje, wat het binnendringen van micro-organismen zou kunnen belemmeren; voorts vestigt hij de aandacht op de bactericide eigenschappen van het eiwit.

Gaiger en Davies (24) vermelden in 1930 eendenkuikenssterfte in Engeland, deze sterfte zou de „Keeldisease” geweest zijn.

Pallaske (55) 1930—'31 vermeldt „*B. enteritidis Gaertner*” infectie bij volwassen vrouwelijke eenden en woerden, waarbij oöphoritis-salpingitis en necrotiseerende orchitis geconstateerd werd. Overbrenging door den woerd en besmetting der eieren door den woerd is volgens hem mogelijk.

Strozzi (71) beschrijft in 1931 enorme sterfte onder jonge eenden, mortaliteit 96 % met als oorzaak *S. typhi-murium*.

Rettger (57) zegt in een artikel over salmonellose bij kalkoenen, dat *salmonella*-infectie veel bij eendjes voorkomt o. a. door „*S. aertrijcke and a very closely related type*”.

Hole (33) (1932) beschrijft één bedrijf besmet met „*b. enteritidis*” en twee bedrijven besmet met „*Aertrijcke types*”. Hij stelde de diagnose bij de gestorven kuikens door te kweken uit de levers. Wat de agglutinatie betreft bij het onderzoek der „*b. enteritidis*” besmetting merkt hij op: „It was also noted that the agglutination with *B. pullorum* antigen was often the more marked”. (Hierover later meer). Het gelukte *Hole* niet de microörganismen in de eieren aan te toonen, doch hij wijst wel op de mogelijkheid van geïnfecteerde eieren. Volgens *Hole* is de diagnose *S. anatum*, gesteld door *Gaiger en Davies*, onjuist geweest. De door deze auteurs beschreven *Salmonella* is een „*b. enteritidis*” geweest. (Dergelijke fouten schijnen meer gemaakt te zijn, want *Kauffmann en Silberstein* (45) vermelden: „Ferner erwies sich ein „*Anatum*” Stamm der Nat. Coll. Nr. 3123 als zur Gärtner Gruppe gehörend IX : g, o, m.).

In 1933 verscheen vrij veel literatuur over eendensalmonellose en bovendien ook over *salmonellose*-gevallen bij den mensch, veroorzaakt door het eten van eendeneieren.

Pallaske (56) die wederom „*Gärtnerinfectie*” bij eenden beschrijft, wijst op de mogelijkheid, dat eieren van buiten af door besmette faeces geïnfecteerd zouden kunnen worden. Voorts legt hij er den nadruk op, dat dieren met een abnormaal ovarium of met ontstoken testikels smetstofverspreiders zijn.

Meyer (50) vermeldt, dat bij voedselvergiftiging van den mensch dik-

wijls eendeneieren verdacht worden, de oorzaak te zijn geweest. Tweemaal gelukte het uit eieren „*Bact. enteritidis gaertner*” te kweken.

Scott, die ook reeds in 1930 en 1932 op voedselvergiftiging door eieren wees, vermeldt ook in 1933 gevallen van „*B. aertrijcke*”. (64, 65 en 66)

Warrack en Dalling (73) (1933) deelen mede, dat eendenkuikenssterfte veroorzaakt kan worden door „*S. aertrijcke*” en door *S. enteritidis gaertner*’. De infectie kan via het ei gaan, doch de kuikens kunnen ook van buiten af besmet worden. Eenden die eieren leggen, welke *Salmonella* bevatten, hebben agglutinenen in het bloed, de agglutinatietiter ten opzichte van „*S. aertrijcke* of „*S. enteritidis gaertner*” wisselt van 1 : 50 tot 1 : 3000. Van 20 eenden, die „*Aertrijcke*” agglutinenen in het bloed hadden, werden 303 eieren onderzocht; uit 8 hiervan werd „*S. aertrijcke*” gekweekt. Bij veel eenden verdwijnen later de agglutinenen, de eieren zijn dan *Salmonellavrij*, men vindt dan in de eend niets van *Salmonella* terug. Bij de geïnfecteerde dieren is uit het ovarium meestal een *Salmonella* te kweken. Dit geldt zoowel voor „*Aertrijcke*” als voor „*Gaertner*”. Als voorbeeld van besmetting van buiten af wordt hier een geval genoemd waar een kunstmoeder (dit is een verwarmingsapparaat voor pas geboren kuikens) besmet met „*S. aertrijcke*”, de oorzaak was. Een geval van „*Gaertner*”besmetting van buiten af hebben deze onderzoekers nog niet waargenomen. De schrijvers raden terecht aan, bij eendenkuikenssterfte de eenden te onderzoeken op agglutinenen; zijn de resultaten negatief, dan moet de oorzaak buiten de eenden gezocht worden.

Müller (52) (1933) vermeldt bij den mensch gevallen van gastroënteritis na het eten van een pudding, waarin eendeneieren verwerkt waren. De gekweekte microörganismen waren aanvankelijk niet beweegelijk en agglutineerden slecht, pas na vele malen overenten en na passage door muizen werd een beweeglijke bacil verkregen, die goed agglutineerde met „*Gaertner*” serum.

Fromme (20) (1933) vermeldt, dat in zijn ambstgebied, van October 1931—September 1932, 15 voedselvergiftigingen geconstateerd werden; in totaal zijn 143 personen ziek geworden, waarvan 2 overleden. Negen maal werden „*Enteritidis Breslau Bazillen*” en vier maal „*Enteritidis Gaertner Bazillen*” gekweekt. Bij al deze gevallen werden eendeneieren verdacht, de oorzaak te zijn. Fromme meent, dat alhoewel een ei kiemen bevatten kan, de bacillen vooral verspreid worden doordat de eioppervlakte besmet is, hij verlangt dan o.a. ook, dat bij de bestrijdingsmaatregelen de eieren gedesinfecteerd moeten worden (dit laatste is een foutieve maatregel, daar ongetwijfeld de reeds in het ovarium besmette dooiers hierdoor geheel onbeïnvloed blijven).

Ongeveer hetzelfde als hierboven genoemd, vindt men terug in de publicatie van Willführ, Fromme und Bruns (75), waarin vooral gewaarschuwd wordt tegen het gebruik van rauwe eendeneieren.

Müller en Rodenkirchen (52) (1933) constateerden eveneens voedselvergiftiging bij den mensch door *Salmonella*. Het betrof hier een „*Gaertner*” infectie na gebruik van „Kartoffelsalat”, bereid met rauwe eendeneieren. Deze auteurs hebben een belangrijke opmerking gedaan, de door hen gevonden „*Gaertner*” bacillen waren gekenmerkt door een vertraagde dulcitolomzetting (de gewone „*Gaertner*” = *S. enteritidis* zet dulcitol juist zeer snel om).

Fürth und Klein (23) (1933) vermelden voedselvergiftigingen bij den mensch na gebruik van eendeneieren, waarbij „Breslau” bacillen gekweekt werden. Ook bij verdachte eenden werden „Breslau” bacillen aangetoond. Ook werden „Breslau” bacillen in het eileiderslijm en op de eischalen aangetoond.

Schaaf (60) (1933) zegt in zijn literatuur overzicht „Unter den in letzter Zeit bekannt gewordenen Lebensmittelvergiftungen nach dem Genusz roher Enteneier (meist holländischer Kalkeier) liesz sich bei zwei Gruppenerkrankungen (vgl. Willführ, Fromme und Bruns 1933, ferner Fürth und Klein 1933) ein Zusammenhang mit deutschen Entenbeständen nachweisen, in denen durch die Kot- und Blutuntersuchung sowie durch die Zerlegung mit *B. enteritidis* Breslau infizierte Tiere ermittelt wurden”. Hij beschrijft een enzoötie onder eendenkuikens, waarbij de sterfte 90 % bedroeg. Uit alle organen, ook uit beenmerg en dooierrest werd „*B. enteritidis* Breslau” gekweekt. Jonge kuikens waren per os te infecteren, oude eenden alleen intraveneus. Contact infectie met eendenkuikens gelukte hem. Voorts wijst hij er nog op, dat vele auteurs van „*Paratyphus B*” spreken „ohne dasz der echte *Paratyphus B* (*Schottmüller*) sicher fest gestellt wurde”.

In 1934 komt *Schaaf* (61 en 62) o.a. tot de volgende punten.

Bij menschen komen voedselvergiftigingen voor door eendeneieren en eendenvleesch. De oorzaken zijn: „*B. enteritidis* Gaertner und Breslau, welche bei Enten die infectiöse Enteritis verursachen”. (Hierbij zij opgemerkt, dat *Schaaf's* vorige publicatie (60) tot titel heeft „Zur infectiösen Enteritis der Enten”, deze benaming is niet te verkiezen, want bij kuikens verloopt de ziekte als septicaemie, bij oude dieren vindt men zeer dikwijls alleen oöphoritis; ook kan de eend lijden aan arthritis, de beste naam daarom is *Salmonellose*, waar iedere vorm van ziek zijn onder begrepen is).

De eenden-*Gaertner*-stammen vergisten dulcitol langzaam, een eigenschap, die in de enteritidisgroep tot nu toe (1934) alleen bij het *moscow* type voorkomt.

De eieren kunnen inwendig besmet zijn en ook van buiten af door de schaal heen besmet worden door besmette faeces. Desinfectie van het ei is volgens hem onmogelijk. De eenigste weg is dus gezonde eendenbedrijven maken.

Beller und Reinhard (3) zeggen van hunne uit eenden gekweekte „*Gärtnerstammen*”: „Bei letzterem lag sechsmal der Typ Jena und einmal der Typ Kiel vor. Die Jenastämme zeigten in kulturellen Hinsicht insofern eine Abweichung, als sie Dulzit nicht zu spalten vermochten”. *Type Kiel* (= *S. enteritidis* var. *dublin*) kan dus bij eenden voorkomen).

Mieschner und Köser (51) 1934 vermelden een geval van voedselvergiftiging, waarbij 50 bezoekers van een bruiloft ziek werden. Eendeneieren bleken de oorzaak te zijn, deze eieren waren afkomstig van 5 eenden. De agglutinatie van het bloedserum der eenden (hoe de agglutinatie verricht is, wordt niet medegedeeld) verliep bij 1 negatief, bij 4 vaag positief. Herhaald eendenfaecesonderzoek gaf geen resultaten. Uit één ei werd „*Bact. enteritidis breslaviense*” gekweekt. Bij sectie der eenden werden bij 2 abnormale eifollikels gezien. De culturen hieruit waren eveneens positief. De uit de eenden gekweekte microorganismen kwamen geheel overeen met die, welke uit de faeces der zieke bruijftsgasten gekweekt waren.

Fromme (21 en 22) (1934) vermeldt „*Breslau*” voedselvergiftigingen in het Ruhrgebied na gebruik van eendeneieren in mayonnaise. *Fromme*, die voortdurend de Nederlandsche eieren als verdacht beschouwt, heeft geen *Salmonellose*, afkomstig van Nederlandsche eieren kunnen aantoonen, wel werd de oorzaak van eenige voedselvergiftigingen gevonden op Duitsche eendenbedrijven.

Bruns en Fromme (10) (1934) geven een opsomming van voedselvergiftigingen bij den mensch en trachten weer de geïmporteerde Nederlandsche eendeneieren verdacht te maken, zij dreigen met een invoerverbod van Nederlandsche eieren. *Sauer* (59) (1934) vermeldt nog een geval van voedselvergiftiging na het eten van een chocoladegerecht bij de bereiding waarvan ook eendeneieren (duitsche!) gebruikt waren; 16 personen werden ziek. Uit de faeces der patienten werden „*Enteritis-Gärtner-Bakterien vom Typ Moskau*” gekweekt (zeer vermoedelijk is het geen *moscow*, doch een *essen* type geweest). Bovendien werd deze bacil op de schaal van een overgebleven eendenei aangetoond. *Haffke* (26) (1934) verrichtte kunstmatige infecties met „*Breslau*” bij eenden. Na 8 dagen werd reeds agglutininenvorming waargenomen.

Seligmann (67) (1935) vermeldt een *S. typhi-murium* massa-vergiftiging door eendeneieren, gebruikt bij mayonaissebereiding. Het is wellicht van nut de klinische verschijnselen, die *Seligmann* noemt, over te nemen.

„Die Inkubationszeit schwankte zwischen wenigen Stunden nach dem Genuss der Mayonnaise und 36 Stunden. Ein Parallelismus zwischen Menge der genossenen Speise und Dauer der Inkubation war nicht festzustellen, ebenso wenig bezüglich der Schwere der Erkrankung.

Das Krankheitsbild wurde allgemein von heftigen, sehr zahlreichen Durchfällen beherrscht, die anfangs meist schmerzlos waren; später stellten sich diffuse Kolikschmerzen ein, die mehrfach noch bestanden, als keine Stuhlentleerungen mehr erfolgten, nur in wenigen Fällen geringe Blutbeimengung.

Die Temperatur stieg gewöhnlich am ersten Krankheitstag auf 39° bis 39.5° und fiel am nächsten Tag bei 20 % der Fälle lytisch ab, bei den übrigen war der lytische Abfall am 3., bei einzelnen am 4. Tag beendet. Die überwiegende Zahl machte — auch bei Fällen mit niedriger Temperatur und geringen Durchfällen — einen schwerkranken Eindruck. Meistens war ein weicher Milztumor zu fühlen der oft 2 fingerbreit den Rippenrand überragte und nach 2—3 Tagen gewöhnlich verschwunden war.

Die Darmerscheinungen klangen nach 4—7 Tagen ab. Bei etwa einem Drittel der Patienten blieb der Puls über die 1. Woche hinaus noch auffallend weich und mässig frequent. Im Durchschnitt dauerte die Rekonvaleszens ca. 14 Tage.

Bakteriologisch ergab sich ein recht einheitliches Bild: bei einer grossen Zahl (43) der Erkrankten fanden sich im Stuhl oder Urin oder in beiden Bakterien aus der Gruppe der Paratyphusbazillen, die serologisch und mit Rücksicht auf das Fehlen der Schleimwallbildung als Breslaubazillen anzusprechen waren, sich von diesen jedoch durch eine sehr schwache Mäusepathogenität und das Fehlen der Rhamnose- und der Tartrat-Reaktion unterschieden.”

Dit laatste: Rhamnose negatief en Tartrat negatief, is een belangrijke opmerking. „Breslau“-infecties bij eenden werden voorts in 1935 bestudeerd door Wesselmann (74) en door Hemshorn (27), die vermeldt, dat reeds 4 dagen na de experimenteële infectie agglutinininen in het bloed aan te toonen zijn; volgens Hemshorn is een agglutinatietiter 1 : 40 dubieus, 1 : 80 positief; gezonde eenden zouden 1 : 20 mogen hebben. Schönberg (63) (1935) onderzocht 50 eieren van 4 besmette eenden, hij kweekte uit 9 eieren „Breslau“-bacillen, hiervan werd 5 \times *alleen in het ei, dus niet op de schaal*, de bacil aangetoond. Volgens hem geschiedt de infectie òf in het ovarium òf in den eileider (het eileiderslijm bevat dikwijls *Breslaubacillen*) òf van buiten af door de faeces.

Overziet men deze gegevens uit de literatuur en beschouwt men deze kritisch, op grond van wat bekend is over de *Salmonella*-groep in het algemeen, dan blijkt, zooals in de inleiding gezegd werd, dat bij de eend voorkomt:

1. *S. anatum*, die in Europa bij eenden nog niet is aangetoond. (wel bij den mensch, *Clauberg, Kristensen*. Zie (45).)

2. *S. enteritidis* var. *dublin*, die slechts 1 maal gevonden is.

3. *S. typhi* murium, die vele malen gevonden is; want de achtereenvolgens genoemde namen: „*paratyphus B*“, „*S. aertrycke*“, „*b. enteritidis Breslau*“, „*Bact. enteritidis Breslau*“, „*B. aertrycke*“, „*Aertrycke types*“, „*Enteritidis Breslau Bazillen*“, „*Breslau bacillen*“, „*Bact. enteritidis breslaviense*“, enz. zijn ongetwijfeld allen verschillende namen voor één en dezelfde bacil, die wij thans op grond van de nieuwe nomenclatuur van de *typhusparatyphus*-groep, zooals die is vastgesteld door het Salmonella-subcomité van het nomenclatuurcomité, ingesteld door de International Society of Microbiology, *Salmonella typhi-murium* dienen te noemen. (72).

4. *S. enteritidis* var. *essen*. In het literatuuroverzicht zijn vermeld de namen: „*S. enteritidis Gaertner*“, „*B. enteritidis Gaertner*“, „*b. enteritidis*“, „*Gaertner*“, „*Bact. enteritidis gaertner*“, „*Enteritidis Gaertner Bazillen*“, „*Gaertnerstämme Type jena die Dulzit nicht zu spalten vermochten*“ (zie *Beller und Reinhard*); het is vrijwel zeker, dat het hier steeds *S. enteritidis* var. *essen* is geweest; ook de „*Enteritis-Gärtner-Bakterien vom Typ Moskau*“ van *Sauer* zijn zeer waarschijnlijk, uit wat nog zal volgen moge dit blijken, *S. enteritidis* var. *essen* stammen geweest.

Het zijn dus *S. typhi-murium* en *S. enteritidis* var. *essen*, die vooral onze aandacht verdienen. Over de eerste, een reeds

lang bekende en alom voorkomende *Salmonella*, is een korte bespreking voldoende; de tweede, sinds 1935 als nieuwe variëteit bekend, zal uitvoerig behandeld worden.

HOOFDSTUK III.

S. typhi-murium.

Het is de vraag of de naam *S. typhi-murium* één *Salmonella* zal blijken te omvatten, dan wel een grooter of kleiner aantal onderling verwante variëteiten gelijk dit in de *S. enteritidis* groep het geval is, waar wij behalve *S. enteritidis* nog kennen *S. enteritidis* var. *danyasz*, var. *chaco*, var. *essen*, var. *dublin*, var. *rostock*, var. *moscow* en var. *blegdam*. In de lijst van *Salmonella*'s samengesteld door de zoojuist genoemde International Society of Microbiology, welke lijst ook is te vinden in het referaat van Collega van Dorssen (13), vinden wij *S. typhi murium* in de B. groep met als antigeenformule IV, V : i : 1, 2, 3.

Voor hen, die in dit deel der bacteriologie niet gespecialiseerd zijn, moge het volgende ter oriëntatie dienen. De *Salmonella*-bacteriën zijn in staat in het dierlijk lichaam agglutininen op te wekken, die uit verschillende componenten blijken te bestaan; het bacterielichaam (het z.g. O-antigeen) wekt O-agglutininen, dus alleen t.o.v. het bacterielichaam op, de flagellen (H-antigeen) wekken H-agglutininen alleen t.o.v. de flagellen op. Bovendien is gebleken, dat zoowel de O als H uit één of meer verschillende componenten kan bestaan. De O componenten worden met Romeinsche cijfers aangeduid, de H componenten met Arabische letters en cijfers. Men komt zoo dus tot een bepaalde agglutinogeenformule, welke voor *S. typhi-murium* is: IV, V : i : 1, 2, 3. Voor verdere finesses, de agglutinogene structuur betreffende zij naar de literatuur verwezen, die daar betrekking op heeft (zie o.a. (18)).

Het is langzamerhand gewoonte geworden, om *Salmonella* te determineeren volgens de agglutinogeenformule; na bacteriscopisch en cultureel te hebben vastgesteld of de bacil tot de groep der *Salmonella*-bacteriën behoort, wordt op grond van de agglutinogene structuur gedetermineerd; hoofdzakelijk aanvullenderwijs worden daarna de cultureelbiochemische eigenschappen nagegaan, het betreft dan vooral de vergisting van koolhydraten (suikers en alcoholen). Wat deze vergisting betreft, vindt men opgegeven volgens Kauffmann (29): dextrose +, mannitol +, arabinose +, dulcitol +, inositol +, rhamnose (Bitter) +, Stern-glycerinebouillon +, xylose +.

Hohn und Herrmann (30, 31, 32) wenschen de klassieke

wijze van determineeren, nl. in eerste instantie indeelen volgens de biochemische eigenschappen, eventueel aangevuld door agglutinatie. Zij gebruiken diverse voedingsbodems o.a. de z.g. Hot-fingerbouillon (waarover later meer), waaraan de koolhydraten zijn toegevoegd, o.a. rhamnose; voor *S. typhi-murium* wordt opgegeven, dat bij rhamnose zuur en gas gevormd wordt. Hier zij onmiddellijk aan toegevoegd, dat het *Hohn und Herrmann* zelf in eerste instantie bekend is, dat dit niet geldt voor elke *S. typhi-murium*, want *Herrmann* beschreef reeds in 1929 rhamnosenegatieve (29) en andere afwijkende (28) „*Breslau typen*”.

Door mij werd nagegaan of mijn *S. typhi-murium* stammen van de eend rhamnose zouden vergisten; *Hohn und Herrmann* hebben ook mijn stammen hierop onderzocht. Hun en mijn resultaten waren, dat zij allen rhamnose negatief zijn; dit zal verderop nader beschreven worden. *Hohn und Herrmann* verwachten, naar zij mij persoonlijk mededeelden, dat in het algemeen de *S. typhi-murium*-stammen in groepen te verdeelen zullen zijn, de oorsprong der stammen zal hierbij van beteekenis zijn. *Edwards* (16a) is van dezelfde meening: „Cultures of *S. aertrycke* can be divided into groups by their reaction towards rhamnose, maltose and xylose in the peptone-saltmedium of Bitter, Weymann and Habs. These groups coincide with the sources of the strains and apparently are of epizoötic significance.” Vermeldenswaard is, dat *Edwards* in zijn publicatie 5 culturen uit eenden van drie verschillende herkomsten noemt, die allen rhamnose-positief waren.

Wat de Nederlandsche stammen betreft, kan de nadruk gelegd worden op de volgende twee belangrijken punten.

a. De agglutinogeenformule volgens de International Society of Microbiology IV, V : *i* : 1, 2, 3 dient m.i. aangevuld te worden met een nieuwe factor XIII. Voor het bewijs hiervan zij verwezen naar wat over *S. enteritidis* var. *essen* vermeld zal worden, deze factor XIII was nl. bij de var. *essen* onbekend, doch bleek ook daar aanwezig te zijn.

b. De *S. typhi-murium*-stammen, die tot nu toe door mij gekweekt werden, zijn allen rhamnose-negatief. Indien dus de medicus bij zijn patiënten, lijdende aan voedselvergiftiging een *S. typhi-murium* (IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3) aantoot, die rhamnose negatief is, dan kan dit voor hem een aanwijzing zijn om aan de eend (ei!) als infectiebron te denken.

S. typhi-murium infectie bij eenden in ons land.

In 1933 werden door mij de eerste gevallen van *S. typhi-murium* infectie bij eenden waargenomen en in 1934 vermeld (34, 35, 36).

(De jaarverslagen van de Rijksseruminrichting vermeldden daarvoor nu en dan gevallen van „*paratyphus*” bij eenden, een beschrijving van deze gevallen en determinatie, welke *Salmonella* het hier betrof, werd evenwel niet in de wetenschappelijke literatuur gegeven.)

S. typhi-murium werd zoowel uit volwassen dieren (vooral uit het ovarium) als uit eendenkuikens (uit alle organen) door mij gekweekt. Steeds werden, als een bacil gekweekt was, eerst de volgende eigenschappen vastgesteld:

Klein staafje, sterk beweeglijk, Gram negatief; aëroob en anaëroob, groeit gemakkelijk op agar (streep en steek), groeit op gelatine (streep en steek) en vervloeit de gelatine niet. Op aardappel ontstaat een wit beslag, op serumagar is de groei zeer goed, eveneens in bouillon en serumbouillon. In den voedingsbodem van Gersbach wordt geen indol gevormd, in peptonkeukenzout-melksuiker is geen gasvorming, in peptonkeukenzout-druivensuiker wel. Melk stolt niet. In lakmoeswei van Petruschky is eerst iets roodkleuring, die later verdwijnt. Op de Gassnerplaat is gele verkleuring; op de Endoplaat is kleurloze groei; neutraalrood slaat om tot geelgroen; in Barsiekownutrose-melksuiker en -rietsuiker ontstaat geen zalmkleurig neerslag; in Barsiekownutrose-druivensuiker wel.

Hierna werden in den regel voor een eerste oriëntatie, agglutinaties verricht met *S. paratyphi B* serum, *S. typhi-murium* serum, *S. cholerae-suis* var. *kunzendorf* serum en *S. enteritidis* serum. Als voorbeeld moge hier volgen de resultaten van een dergelijke agglutinatie, die verricht werd met antigeen van *S. typhi-murium* eendenstam VII.

Serum-verdunning	<i>S. paratyphi-B</i> -serum IV, V, XIII; b: 1, 2	<i>S. typhi-murium</i> serum IV, V, XIII: i; 1, 2, 3	<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> VI, VII; 1, 3, 4, 5	<i>S. enteritidis</i> IX, XIII: g, o, m
1 : 50	+++	+++	+++	+
1 : 1000	+++	+++	+++	—
1 : 2000	+++	+++	—	—
1 : 4000	+++	+++	—	—
1 : 8000	+++	++	—	—
1 : 10000	++	+	—	—
— negatief. + gering positief. ++ duidelijk positief.				
+++ zeer duidelijk positief.				

Aan de agglutinogeenformules is hier toegevoegd de reeds genoemde factor XIII, die hoewel zwak aanwezig, (zie hierover verderop) toch merkbaar is. Indien wij als punt van uitgang voor de beoordeeling het eindresultaat van het geheele onderzoek nemen, nl. de diagnose *S. typhi-murium* IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3, dan blijkt dat de agglutinatatie met *S. paratyphi-B* serum tot voorbij 1 : 10000 berust op de gemeenschappelijke factoren IV, V, XIII : 1, 2.; de agglutinatatie met *S. cholerae-suis* var. *kunzen-dorf* serum 1 : 1000 berust op de factoren 1 en 3 (vlokkige H agglutinatie) en de geringe agglutinatie 1 : 50 met *S. enteritidis* serum op factor XIII (korrelige O agglutinatie).

Zet men de agglutinatie direct bij hooge verdunning in, dan ontgaan ons de positieve agglutinaties met de gering verwante sera, bv.: de uitslagen met den eendenstam VI:

Serum-verdunning.	<i>S. paratyphi-B</i> -serum IV, V, XIII: <i>b</i> : 1, 2	<i>S. typhi-murium</i> serum IV, V, XIII: <i>i</i> : 1, 2, 3	<i>S. cholerae suis</i> var <i>kunzen-dorf</i> VI, VII: 1, 3, 4, 5	<i>S. enteritidis</i> IX, XIII; <i>g. o. m</i>
1 : 2000	+++	+++	—	—
1 : 10000	+++	++	—	—
1 : 30000	++	++	—	—
— negatief. + gering positief. ++ duidelijk positief. +++ zeer duidelijk positief.				

Zoodra men zoover is, is het waarschijnlijk, dat de te onderzoeken *Salmonella* een *S. paratyphi-B* of een *S. typhi-murium* is. (Daar men met verhit antigeen (geesels verdwenen) positieve O agglutinaties krijgt met *S. paratyphi B* serum en *S. typhi-murium* serum komt, de *S. aberdeen* XI : *i* : 1, 2, 3 (69) niet in aanmerking). Voor verdere determinatie gaat het nu vooral om het aantoonen van de factor *i*, omdat deze factor, behalve dan bij de in een geheel andere groep thuis behorende *S. aberdeen* alleen bij *S. typhi-murium* voorkomt. Deze *i* werd steeds aangetoond door met verzadigde sera te werken. *S. paratyphi-B* serum bevat IV, V, XIII : *b* : 1, 2 agglutinininen, voegt men nu hierbij een overmaat van *S. typhi-murium* bacillen (dus IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3 antigeen) dan blijft in het serum alleen de *b* agglutinine over. Omgekeerd blijven bij verzadiging van *S. typhi-murium* serum (IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3 agglutinininen) alleen *i* en

3 agglutininen over. Krijgt men nu met het verzadigde *S. paratyphi-B* serum (alleen *b.* agglutinine) toch nog een agglutinatatie, dan is de bacil een *S. paratyphi-B*, omgekeerd geeft het verzadigde *S. typhi-murium* serum alleen een agglutinatatie met *S. typhi-murium*. Deze verzadigingsmethode gaf met den bovengenoemden „stam VI” de volgende resultaten:

Verzadigd *S. typhi-murium* serum plus een bekend *S. paratyphi B* antigeen gaf geen agglutinatatie; alle verdunningen (1 op 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000) negatief. Verzadigd *S. typhi-murium* serum plus een bekend *S. typhi-murium* antigeen gaf agglutinatatie tot in de verdunning 1 : 500. Verzadigd *S. typhi-murium* serum plus stam VI antigeen gaf agglutinatatie tot in de verdunning 1 : 500.

Verzadigd *S. paratyphi-B* serum plus bekend *S. paratyphi-B* antigeen gaf agglutinatatie in alle verdunningen (1 : 1000 nog positief). Verzadigd *S. paratyphi-B* serum plus bekend *S. typhi-murium* antigeen gaf geen agglutinatatie (alle verdunningen —). Verzadigd *S. paratyphi-B* serum plus stam VI antigeen gaf geen agglutinatatie (in geen enkele verdunning was grofvlokkige agglutinatatie te zien, alleen in het eerste buisje 1 : 50 was een fijne korreling waarneembaar, die echter zeer gering was).

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat de uit een eend gekweekte stam VI een *S. typhi-murium* moet zijn. Bovendien werden met de factoren sera IV en V (bereid door *Hohn en Herrmann*) de IV en de V factor afzonderlijk vastgesteld bij de stammen Eend VI, Eend VIII en Eend T XI; bij stam T III werd alleen factor IV aangetoond. *Hohn en Herrmann* hadden dezelfde bevindingen, zij toonden bovendien bij alle stammen 1, 2 en 3 aan. Voegt men hier nog bij de verderop te bespreken factor XIII dan is dus, met uitzondering van stam Eend T III, de agglutinogeenformule IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3.

HOOFDSTUK IV.

S. enteritidis var. *essen*.

Deze *Salmonella*, die tot voor kort nog niet van een eigen naam voorzien was, werd, zooals reeds vermeld is, door verschillende onderzoekers in diverse landen bij eenden bestudeerd. De laatste paar jaren werden door enkele auteurs de

eigenschappen van deze *Salmonella* intensief nagegaan. Het bleek, dat deze bacil thuis hoort in de *enteritidis*groep; de agglutinaties ter oriëntering in welke groep een gekweekte eensalmonella thuis behoorde, leverde bv. van stam III de volgende resultaten op:

Serumver- dunning 1 op:	<i>S. paratyphi-B</i> serum IV, V, XIII: b: 1, 2	<i>S. typhi-murium</i> serum IV, V, XIII: t: 1, 2, 3	<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> VI, VII; 1, 3, 4, 5	<i>S. enteritidis</i> IX, XIII; g, o, m
600	—	+	—	+++
800	—	—	—	+++
1200	—	—	—	+++
1600	—	—	—	+++
2000	—	—	—	+++
4000	—	—	—	+++
6000	—	—	—	+++
30000	—	—	—	+
— negatief.				
+ gering positief.				
+++ zeer duidelijk positief.				

De *Salmonella enteritidis* van de eend blijkt zich te kenmerken door vertraagde omzetting van de dulcitol. Het eerst werd op deze vertraagde dulcitolomzetting gewezen door *Müller en Rodenkirchen* (52). Uit verdachte eendeneieren werden „Gaertnerbazillen” gekweekt overeenkomende met *Jena* stammen. „Sämtliche Stämme wurden von Gaertnerserum bis zum Endtiter agglutiniert”, en vormden in dulcitol pas na 48 uur zuur en daarna iets gas. Deze stammen werden geïsoleerd te Mühlheim (Ruhr). Uit de publicatie van *Müller en Rodenkirchen* blijkt niet met zekerheid, dat het hier *Jenastammen* betreft, daar verdere agglutinaties niet vermeld worden, doch in elk geval betreft het hier een *Salmonella*, die in de *enteritidis*groep thuis behoort, doch dulcitol vertraagd omzet, terwijl van *Jena* stammen juist bekend is, dat deze zeer snel dulcitol omzetten; de eenige toen bekende trage dulcitolvergister uit de *enteritidis*-groep was *S. enteritidis* var. *moscow*. *Beller und Reinhard* (3) schrijven: „Bei letzterem (= *Bacterium enteritidis* Gärtner) lag sechsmal der Typ Jena und einmal der Typ Kiel vor. Die Jenastämme zeigten in kultureller Hinsicht insofern eine Abweichung, als sie Dulzit nicht zu spalten vermochten”.

Schaaf (61, 62) vindt eveneens vertraagde dulcitolomzet-

ting evenals, zooals hij in zijn publicatie vermeldt, *Hohn*: „Aehnliche Feststellungen machte unabhängig vor mir auch Hohn. Er bezeichnet die von mir untersuchten Stämme als Moskau-typen”.

Bij de determinatie van *Salmonellastammen* worden zowel de serologische als de cultureele biochemische onderzoeksmethoden toegepast. *Herrmann* (28, 29) geeft de voorkeur aan de laatste; hij zegt: „Die kulturelle-biochemische Differenzierung, insbesondere durch die Vergärung, leistet mehr als die serologische Typentrennung, vorausgesetzt, dass optimale und einheitliche Nährsubstrate verwendet werden”. Dezelfde opvatting vindt men terug in de publicatie van *Hohn en Herrmann* (30), waarin zij schrijven: „der direkte Nachweis des Moskau-typs erbrachten wir durch die Analyse eines Gärtnerstammes der uns von Herrn Direktor Dr. Müller — Duisburg zugesandt wurde, den er mit Dr. Rodenkirchen aus 3 zusammengeschlagenen Eiern isoliert und als Gärtnerstamm identifiziert hatte. Die eingehende Untersuchung bei uns nach den obigen dargelegten Prinzipien ergab, dass es sich bei dem Enteneistamm aus Duisburg um den Moskaustyp handelte.” „Der Vollständigkeit halber wurden 5 Moskaustämme mit Oranienburgserum, welches den von Kauffmann für den Jenatyp eigentümlichen Faktor m besitzt, agglutiniert. Der Jenastamm des Robert Koch-Institutes wurde in reiner H. Form von dem Oranienburgserum des R.G.A. agglutiniert. Unsere Moskaustypen dagegen blieben ganz unberührt.”

Ondertusschen publiceerde *Boecker* (7), die zeer veel waarde hecht aan het serologisch onderzoek, de resultaten, die hij met enteritidis-stammen van de eend verkregen had; hij schrijft: „Ferner wurde der dem Typus Gärtner-Jena eigentümliche Faktor m durch flockige Agglutination in Serum Oranienburg bei allen Kulturen mit Sicherheit nachgewiesen. Es handelte sich somit zweifellos um eine durch verzögerte Dulziterlegung charakterisierte Minusvariante des Typus enteritidis Gärtner-Jena und sicher nicht um den Typus Moskau.” Ook mijne, in de *enteritidis*groep behorende, Nederlandsche eendenstammen zetten allen de dulcitol vertraagd om. Daar volgens *Kauffmann* (44) dit alleen het geval is bij het *moscow*-type, meende ik mijn stammen te moeten beschouwen als *S. enteritidis* var. *moscow* (36, 37). De hierboven genoemde literatuur, vooral

het artikel van *Boecker*, was voor mij een aanleiding de eendenstammen nauwkeurig te onderzoeken. Dr. J. Schaaf (Giessen) en Prof. E. Boecker (Berlin) waren zoo welwillend, zoowel enkele benoodigde sera, als enkele Duitsche eendensalmonellastammen af te staan. Dank zij deze door mij zeer gewaardeerde medewerking heb ik de Nederlandsche stammen met de Duitsche kunnen vergelijken. De stam van Dr. Schaaf werd in diens brief genoemd: *B. ent. Gärtner „Erpel”*, Prof. Boecker zond „von den westdeutschen Dulzitin negativen *Gärtner Jena Stämme* die Nr. 972 und 7”.

Thans volgen de door mij verkregen resultaten; hierbij zij opgemerkt, dat ik mij gehouden heb aan de publicatie „The Genus *Salmonella* Lignieres, 1900 by the *Salmonella* subcommittee of the nomenclature committee of the international society for microbiology”. (72).

De proeven die nu volgen, 1—23, werden verricht vóór het vinden van factor XIII, in de gebruikte formules is factor XIII daarom nog weggelaten, alleen waar het van nut bleek factor XIII even te noemen, is dit geschied.

Het O antigeen = IX.

Dat de *salmonella enteritidis* van de eend de lichaamsantigeenfactor IX bezit, bleek uit de volgende agglutinaties.

1. Met *salmonella gallinarum* serum (IX) werden agglutinaties ingezet met door verhitte gedooide culturen van *S. pullorum* en vier stammen van *S. eend*.

Het resultaat was:

	Serumverduunning.				
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600
<i>S. pullorum</i>	+	+	+	+	—
<i>S. eend I</i>	+	+	+	—	—
<i>S. eend II</i>	+	+	+	—	—
<i>S. eend III</i>	+	+	+	—	—
<i>S. eend IV</i>	+	+	+	+	—
<i>S. typhi-murium</i> (muis)	+	—	—	—	—

Hieruit blijkt, dat het lichaamsantigeen van *Salmonella eend* gelijk is aan dat van van *S. pullorum* en *S. gallinarum*, nl. de O factor IX. (De + reactie met *S. typhi-murium* antigeen met

serumverduunning 1 : 100 komt door de later te bespreken factor XIII).

2. Bovendien bleek bij tientallen bloeddruppelagglutinaties en bloedserumagglutinaties bij kippen, lijdende aan chronische *morbus pullorum*, dat deze agglutinaties zoowel met *S. pullorum* antigeen als met *Salmonella-eend* antigeen positief verlopen. De IX moet dus gemeenschappelijk zijn. Deze agglutinaties werden verricht in den vorm van een z.g. snelagglutinatie met geconcentreerd, door crystalviolet gekleurd antigeen.

3. Ook met serum van een zieke eend (eend No. 1539) kon de IX factor aangetoond worden door dit serum te onderzoeken met 30 min. op 100° C verhit *S. enteritidis* var. *danysz* antigeen (IX : g, o, m). Door de verhitting gaat het H antigeen (g, o, m) ten gronde en blijft dus alleen factor IX over.

Serum eend 1539 verduunning:	Verhit <i>S. enteritidis</i> var. <i>danysz</i> antigeen
1 : 10	+++ fijnkorrelige O-agglutinatie met opheldering.
1 : 20	++ fijnkorrelige O-agglutinatie deels opheldering.
1 : 40	+
1 : 80	+
1 : 160	—
1 : 320	—

Hieruit blijkt dus de aanwezigheid van factor IX.

Met ditzelfde serum werd een contrôle agglutinatie ingezet met *S. typhi-murium*, die geen IX bezit; de agglutinatie verliep dan ook vrijwel negatief (alleen in de lage verdunningen was iets korrelige O-agglutinatie door de achteraf gevonden en te beschrijven factor XIII).

4. Bovendien bleek duizenden malen dat eenden met een positieve *Salmonella-eend*-agglutinatie tevens minstens zoo sterk een positieve agglutinatie gaven met *S. pullorum*. De IX factor moet dus gemeenschappelijk zijn.

Het H antigeen bevat de g factor.

Dat de *Salmonella-eend* in de enteritidisgroep thuis behoort (de typen van deze groep bevatten allen de g en al of niet tevens een p factor) bleek uit de agglutinaties van deze stammen met *S. enteritidis* var. *dublin* (IX : g, p) serum.

5. Het antigeen werd gemaakt door de bacteriën te behandelen met carbol, waardoor het O antigeen, in dit geval dus de IX, vrijwel uitgeschakeld wordt. Alle onderzochte stammen werden grofvlokkig (= H agglutinatie) geagglutineerd tot een verdunning van ongeveer 1 : 32000. Daarentegen verliepen de agglutinaties met *S. paratyphi-A* (I, II : *a*) —, *S. paratyphi-B* (IV, V : *b* : 1, 2) —, *S. typhi-murium* (IV, V : *i* : 1, 2, 3) —, *S. cholerae-suis* var. *kunzendorf* (VI, VII : 1, 3, 4, 5) — en *S. anatum-serum* (X, III : *e, h* : 1, 4, 6) geheel negatief.

6. Ook in het serum van eend 1539 kon de *g* invloed waargenomen worden, want met *S. derby* carbolantigeen (IV : *f, g*) werd bij 1 : 10 en 1 : 20 (en gering bij 1 : 40) een grofvlokkige agglutinatie met opheldering waargenomen, terwijl de contrôle-agglutinatie met *S. typhi-murium* (IV, V : *i* : 1, 2, 3) weliswaar in lage verdunning zeer geringe O agglutinatie (factor XIII) gaf, doch in het geheel geen vlokkige H agglutinatie.

7. Met *S. enteritidis* (IX : *g, o, m*) carbolantigeen ging de titer van het serum van eend 1539 tot 1 : 320, behalve het aanwezig zijn van de *g* factor is dus het bestaan van *o, m*, ook waarschijnlijk.

Het H antigeen bevat de o factor.

8. De *o* factor is aangetoond kunnen worden door het serum van eend 1539 te verzadigen met *S. enteritidis* var. *dublin* (IX, *g, p*), zoodat de factoren IX en *g* uitgeschakeld werden, daarna werd een duidelijk grofvlokkige agglutinatie verkregen met *S. enteritidis* var. *moscow* (IX : *g, o, q*) in de verdunning 1 : 20 (Contrôle met *S. ent.* var. *dublin* 1 : 20 negatief).

9. Het serum van eend 1539 werd ook verzadigd met *S. derby* (IV : *f, g*), daarna werd een duidelijk grofvlokkige agglutinatie verkregen met *S. enteritidis* var. *moscow* carbolantigeen ((IX) *g, o, q*) in de verdunning 1 : 20 en 1 : 40 (1 : 80 gering). (Contrôle met *S. derby* 1 : 20 negatief).

De *q* factor kan niet aanwezig zijn (zie proef 19).

Het H antigeen bevat de m factor.

Dit deel van het onderzoek is het voornaamste, omdat de *m* niet bij type „*moscow*”, wel bij *S. enteritidis* voorkomt. Ten einde de *m* factor te kunnen aantonen, werden proeven inge-

steld met *S. oranienburg* serum (VI, VII : *m*, *t*) ons welwillend beschikbaar gesteld door Prof. Boecker. Dit serum werd allereerst op zijn werkzaamheid onderzocht. Er werd een agglutinatatie ingezet met levend *S. oranienburg*antigeen, teneinde de sterkte van het serum te kunnen beoordeelen; positieve agglutinatatie werd verkregen tot voorbij 1 : 40000 (observatie geschiedde na 2 uur). Hierna werd de *m* titer bepaald door het *S. oranienburg*serum (VI, VII : *m*, *t*) te agglutineeren met levende cultuur van *S. enteritidis* (IX : *g*, *o*, *m*), na 2 uren bleek deze *m* titergrens te liggen bij 1 : 640, nl. grofvlokkige agglutinatatie (na 24 uur eveneens 1 : 640). Hierna werd de *m* titer nogmaals bepaald door te agglutineeren met *S. enteritidis* var. *danysz* (IX : *g*, *o*, *m*), na 2 uur bleek wederom de *m* titer te liggen bij 1 : 640 (grofvlokkige agglutinatatie). Met een levende cultuur van een *S. enteritidis* var. *dublin* (IX : *g*, *p*) afkomstig van een kalf en met een levende cultuur van *S. enteritidis* var. *dublin* afkomstig van een zilvervos werd geen agglutinatatie waargenomen (negatieve contrôle).

10. Na deze voorbereidende agglutinatatieproeven werden met dit *S. oranienburg*serum (VI, VII : *m*, *t*) de volgende eendenstammen onderzocht.

	na 2 uur	na 24 uur
1. „Erpel” (ontv. v. Dr. Schaaf)	1 : 320 +	1 : 640 +
2. „Jena 7” (ontv. v. Prof. Boecker)	1 : 640 +	„
3. „Jena 972” (ontv. v. Prof. Boecker)	1 : 640 +	„
4. Eend I (Jansen)	1 : 640 +	„
5. Eend III „	1 : 640 +	„
6. Eend IV „	1 : 640 +	„
7. Eend V „	1 : 320 +	„
8. J. E. „	1 : 640 +	„
9. T. 1539 „	1 : 320 +	„
10. T. 653 „	1 : 640 +	„
11. T. 652 „	1 : 640 +	„
12. T. 2066 „	1 : 640 +	„
13. T. 591 „	1 : 320 +	1 : 320 +

Het blijkt dus, dat nagenoeg alle eendenstammen geagglutineerd worden tot de *m* titergrens, het is dus vrijwel zeker, dat de *m* factor in de *Salmonella* van de eend aanwezig moet zijn (de *t* factor komt namelijk in de geheele D groep (enteritidis-groep) niet voor). Het is van belang nog op te merken, dat wij de stammen „Jena 7” en „Jena 972” van Prof. Boecker ontvingen

met de opmerking, dat zij „mangelhaft begeisselt” waren. Dit bleek inderdaad zoo te zijn, daar in de hangende druppel nage-
noeg geen eigen beweging was waar te nemen. Door deze stam-
men binnen 48 uur 3 passages in serumbouillon te laten maken,
nam de beweeglijkheid behoorlijk toe, zoodat tenslotte een
m factor bij 1 : 640 aangetoond werd. Zonder deze voorberei-
dende maatregelen was dit waarschijnlijk niet gelukt.

11. Ook het serum van eend 1539 gaf nog de aanwijzing
dat deze *m* factor aanwezig is, het gaf namelijk met *S. oranien-
burg*-carbolantigeen (VI, VII : *m*, *t*) een grofvlokkige agglutinatie
bij 1 : 10 en 1 : 20. Dat het inderdaad de *m* en niet de *t* factor is,
blijkt uit het volgende:

12. *S. oranienburg*serum (VI VII : *m*, *t*), verzadigd met
S. enteritidis (IX : *g*, *o*, *m*) gaf:

1. in het geheel geen agglutinatie (1 : 20 neg.) met *S. enteritidis*
(IX : *g*, *o*, *m*);
2. in het geheel geen agglutinatie (1 : 20 neg.) met *S. enteritidis*
Eend I;
3. in het geheel geen agglutinatie (1 : 20 neg.) met *S. enteritidis*
Jena 972.

Nu dus de *m* uit het *S. oranienburg*serum weggenomen is,
worden de eendenstammen niet meer geagglutineerd, de *t* ag-
glutinenen waren nog ongeschonden aanwezig, doch veroor-
zaakten geen agglutinatie, de eendenstammen bevatten dus al-
leen een *m* factor, maar geen *t* factor.

13. Ten overvloede werden nog de volgende agglutinaties
verricht. *S. oranienburg*serum (VI, VII : *m*, *t*) verzadigd met
S. Eend I antigeen gaf:

1. in het geheel geen agglutinatie (1 : 20 neg.) met *Salmonella*
Eend I antigeen;
2. in het geheel geen agglutinatie (1 : 20 neg.) met *S. enteritidis*
(IX : *g*, *o*, *m*) antigeen;
3. een prachtige grofvlokkige agglutinatie met *S. oranienburg*-
carbolantigeen (VI, VII : *m*, *t*).

Uit 1 en 2 blijkt, dat de stam Eend I de *m* factor volledig
weggenomen heeft en uit 3 volgt, dat *t* nog volledig aanwezig
was.

Reeds eerder was opgemerkt, dat bij het gebruiken van het
*S. oranienburg*serum met antigeen, spontaan soms een gering
atypische neerslag optrad, dat in tegenstelling met de positieve

bevindingen (grofvlokkige niet te suspendeeren H-agglutinatie) direct weer door de vloeistof te schudden was. Bij de agglutinaties van proef 13 was dit ook iets het geval; dat dit ook optrad met *S. derby* (IV : *f*, *g*) bewijst het atypische karakter. Dit moge als volgt toegelicht worden.

S. oranienburgserum (V, VII : *m*, *t*) en levende *S. derby* (IV : *f*, *g*) werden bij elkaar gevoegd, hier is geen enkele component gemeenschappelijk en alle agglutinaties moeten dus negatief verlopen. Bij 1 : 10 en 1 : 20 en ook zeer gering bij 1 : 40 werd de hierboven bedoelde storing waargenomen (observatie 2 uur), na 24 uur was de storing in alle buisjes merkbaar (contrôle phys. NaCl plus *S. derby* was goed negatief). Dat de oorzaak niet gelegen was in de *S. derby*, bleek door *S. derby* samen te brengen met normaal serum van drie verschillende konijnen; een agglutinatie of iets wat daarop zou kunnen gelijken, bleef uit. De oorzaak van de storing moet dus gezocht worden in het *S. oranienburgserum*. Om dit nader te bewijzen en tevens om de storing te elimineeren, werd het *S. oranienburgserum* (VI, VII : *m*, *t*) verzadigd met levende *S. derby* (IV : *f*, *g*) nu werd opnieuw de agglutinatie met *S. derby* ingezet, waarna in geen enkel buisje neerslag meer ontstond.

14. Met dit *S. oranienburgserum*, verzadigd met *S. derby*, werd nu nogmaals de *m* titer bepaald door een agglutinatieproef in te zetten met *S. enteritidis* (IX : *g*, *o*, *m*); wederom was de titer 1 : 640 (zoowel na 2 uur als na 24 uur). Met levend antigeen *S. Eend I* waren de resultaten na 2 uur 1 : 320, na 24 uur 1 : 640. Met levend antigeen „Jena 972”, na 2 uur 1 : 160, na 24 uur 1 : 320. De agglutinaties van „Jena 972” waren in alle buisjes wat zwakker, ook de titer was lager, wat toe te schrijven is aan de „mangelhafte Begeisselung”, die door eenige agar-passages toch weer ontstaan was. Dit was eveneens merkbaar bij het volgende:

15. *S. oranienburgserum* (VI, VII : *m*, *t*) verzadigd met „Jena 972” gaf een zeer sterke daling, doch niet geheele verdwijning van de *m* titer (mangelhafte Begeisselung).

Op grond van de besproken experimenten is het wel zeer waarschijnlijk te achten, dat de *Salmonella enteritidis* van de eend de antigeenfactoren IX, *g*, *o*, en *m* heeft.

16. Hierna werden de proeven voortgezet door een konijn voor te behandelen met stam „Eend I”. Nadat serum gewonnen

was, werden de eigenschappen voor diverse stammen bepaald; hierbij werd steeds levend antigeen gebruikt.

Serum konijn, „Eend I”		na 2 uur	na 24 uur
1. + <i>S. enteritidis</i> var. <i>danzysz</i>	IX: g, o, m	1 : 1600 +; gemengd (grofvl. + korrelig)	1 : 6400 +; gemengd.
2. + <i>S. enteritidis</i>	IX: g, o, m	idem	idem
3. + <i>S. ent. Eend I</i>		idem	idem
4. + <i>S. enteritidis</i> <i>Jena 972</i>		= 1, 2, & 3, doch zwakker	idem
5. + <i>S. enteritidis</i> „Erpel”		= 1, 2 & 3.	1 : 3200 +
6. + <i>S. ent. var.</i> <i>Moscow</i>	IX: g, o, q	idem	1 : 3200 +; gemengd.
7. + <i>S. ent. var.</i> <i>dublin</i>	IX: g, p	1 : 800 + korrelige O-agglutinatie.	1 : 3200 +; korrelig.
8. + <i>S. derby</i>	IV: f, g	1 : 80 +; grofvl.	1 : 200 +; grofvlokkig.
9. + <i>S. oranien-</i> <i>burg</i>	VI, VII : m, t	1 : 200 +; grofvl.	1 : 200 +; grofvlokkig.
10. + <i>S. pullorum</i>	IX	1 : 1280 +; korrelig	1 : 10000 +; korrelig
11. + <i>S. typhi-</i> <i>murium</i> (stam muis)	IV, V: i : 1, 2, 3	negatief.	1 : 100 +; gering korrelig neerslag (door factor XIII).
12. + <i>S. typhi-</i> <i>murium</i> *)	IV,	„	1 : 320 +; korrelig (XIII).

*) geesellooze stam door v. Dorssen geïsoleerd uit een duif.

De hierna verrichte proeven werden gedaan met carbol-antigeen; dat het carbol geen storende werking heeft op het serum bleek uit de agglutinaties, die ingezet werden met antigeen van „Eend I” en van *S. enteritidis*, ook nu was de H-titer 1 : 6400. Voor de eenvoudigheid zal in de onderstaande proeven het „konijnserum „Eend I” aangeduid worden als K.

17. K. verzadigd met *S. dublin* (IX : g, p) + antigeen:

- | | | |
|--|-------------|---|
| 1. <i>S. dublin</i> (IX : g, p) | : 1 : 20 — | |
| 2. <i>S. derby</i> (IV : f, g) | : 1 : 20 — | |
| 3. <i>S. eend I</i> | : 1 : 320 + | } grofvl. hogere verd.
niet ingezet. |
| 4. <i>S. ent. v. moscow</i> (IX : g, o, q) | : 1 : 320 + | |

18. K verzadigd met *S. derby* (IV : f, g) + antigeen:

- | | | |
|---|-------------|-----------|
| 1. <i>S. derby</i> (IV : f, g) | : 1 : 20 — | |
| 2. <i>S. dublin</i> (IX : g, p) | : neg. | |
| 3. <i>S. eend I</i> | : 1 : 320 + | } gemengd |
| 4. <i>S. ent. v. mosc.</i> (IX : g, o, q) | : 1 : 320 + | |
| 5. <i>S. enterit.</i> (IX : g, o, m) | : 1 : 320 + | |

(De uitslag na 2 uur was gelijk aan die na 24 uur)

19. K verzadigd met *S. enterit.* (IX : *g, o, m*) + antigeen:

- | | |
|---|----------|
| 1. <i>S. ent.</i> (IX : <i>g, o, m</i>) | 1 : 20 — |
| 2. <i>S. dublin</i> (IX : <i>g, p</i>) | 1 : 20 — |
| 3. <i>S. ent. v. mosc.</i> (IX : <i>g, o, q</i>) | 1 : 20 — |
| 4. <i>S. oranienburg</i> (VI, VII : <i>m, t</i>) | 1 : 20 — |
| 5. Eend I | 1 : 20 — |
| 6. <i>S. derby</i> (IV : <i>f, g</i>) | 1 : 20 — |

Uit deze proef blijkt o.a., dat K de q-factor niet bevat, noch eenige andere factor dan de componenten van *S. enteritidis*.

- | | |
|---|-------------------|
| 20. 1. K verzadigd met „Eend I” + antigeen Eend I | 1 : 20 — |
| 2. K verzadigd met „Eend I” + antigeen Erpel | 1 : 20 — |
| 3. K verzadigd met „Eend I” + antigeen Jena 972 | 1 : 20 — |
| 4. K verzadigd met „Eend I” + antigeen <i>S. ent.</i> (IX; <i>g, o, m</i>) | 1 : 20 — |
| 21. 1. K verzadigd met „Jena 972” + antigeen Jena 972 | 1 : 20 — |
| 2. K verzadigd met „Jena 972” + antigeen Eend I | 1 : 20 — |
| 3. K verzadigd met „Jena 972” + antigeen
<i>S. oranienburg</i> (VI, VII : <i>m, t</i>) | 1 : 20 — |
| 22. 1. K verzadigd met <i>S. ent. var. moscow</i> + antigeen
<i>S. ent. v. moscow</i> (IX : <i>g, o, q</i>) | 1 : 20 — |
| 2. K verzadigd met <i>S. ent. var. moscow</i> + antigeen
<i>S. enteritidis</i> (IX : <i>g, o, m</i>) | 1 : 320 + grofvl. |
| 3. K verzadigd met <i>S. ent. var. moscow</i> + antigeen
eend I | 1 : 320 + grofvl. |

23. Een tweede konijn werd voorbehandeld met *S. enteritidis* (IX : *g, o, m*). Het serum van dit dier, dat toen het gebruikt werd, een titer had van 1 : 2560 voor *S. enteritidis* en 1 : 1280 voor „Eend I”, werd verzadigd met „Eend I”-antigeen; hierna werden agglutinaties ingezet met Eend I antigeen en *S. enteritidis* (IX : *g, o, m*). Deze agglutinaties verliepen reeds van 1 : 10 af negatief.

Bij een belangrijk deel van deze proeven (het aantoonen der factoren *g, o* en *m*) genoot ik de medewerking van *Dr. v. Dorsen*. Uit de beoordeeling en onderlinge vergelijking van de resultaten der proeven van 1 tot en met 23 blijkt, dat de antigeenfactoren IX : *g, o, m* allen aanwezig zijn.

Dit deel van het onderzoek naar de antigeenstructuur werd verricht toen de door *Kauffmann* (46) vermelde factor XII en de door mij nog nader te bespreken factor XIII (die ongetwijfeld dezelfde is als factor XII van *Kauffmann*) nog niet met zekerheid was vastgesteld. Deze proeven werden daarom destijds vermeld (40) met als einddiagnose: agglutinogeenformule IX : *g, o, m*, terwijl de geringe korrelige O-agglutinatie als bv. ver-

meld in proef 16 achter 11 en 12 niet genoemd werden, omdat deze agglutinaties met *S. typhi-murium* zeer gering en niet te verklaren was. Ondertusschen is dit punt, waarop ik in verschillende publicaties steeds wel heb gewezen, opgelost geworden. Vooral bij het werken met *S. typhi-murium* antigeen en *S. enteritidis* var. *essen*-antigeen in de praktijk der eendensalmonellose-bestrijding moest wel voortdurend de aandacht vallen op een dikwijls òf vaag òf duidelijk wederzijdsch reageeren. Honderden malen werd namelijk gezien, dat een eendenserum, dat een sterk positieve *essen*-reactie gaf met *essen*-antigeen, tevens een positieve *S. typhi-murium*-reactie gaf en omgekeerd, terwijl dit op grond van de formules IX : *g, o, m* en VI, V : *i* : 1, 2, 3 toch niet mogelijk zou kunnen zijn.

Ook *S. pullorum* bleek met *S. typhi-murium* dezelfde wederzijdsche agglutinatorische verwantschap te hebben, alhoewel ook daarvan de agglutinogeenformule (IX) geen verwantschap toont met de *S. typhi-murium* (IV, V : *i* : 1, 2, 3). De oplossing voor dit verschijnsel is thans gevonden, het is gebleken dat er nog een extra agglutinogeen factor bij *S. enteritidis* var. *essen* en *S. pullorum* voorkomt, die ook aanwezig is bij *S. typhi-murium*. Dat deze nieuwe factor, die XIII genoemd dient te worden, moet bestaan, moge blijken uit de volgende experimenten.

I. Van een kip lijdende aan chronische *morbus pullorum* werd serum verzameld. Met dit serum werden agglutinaties ingezet met levende bacterie suspensies van *S. pullorum*, *S. enteritidis* var. *essen* en *S. typhi-murium*; de agglutinaties werden na 2 en na 20 uur afgelezen, de einduitslag was:

	verduunning van het <i>S. pullorum</i> serum IX, ?.			
	1 : 40	1 : 160	1 : 80	1 : 320
<i>S. pullorum</i> antigeen IX, ?.	+	+	+	+
	met opheldering	met oph.	met oph.	iets oph.
<i>S. ent. var. essen</i> ant. IX, ? : <i>g, o, m</i> .	+	+	+	+
	met oph.	met oph.	met oph.	iets oph.
<i>S. typhi-mur.</i> ant. IV, V, ? , <i>i</i> , 1, 2, 3.	+	+	?	?
	iets oph.	iets oph.	geen oph.	geen oph.
+ = positieve fijnkorrelige agglutinaties (de controles alleen antigeen en alleen serum negatief)				

Hierna werd een hoeveelheid van hetzelfde *S. pullorum*-serum verzadigd met *S. typhi-murium* bacillen, nu was het eindresultaat:

	verduunning van het <i>S. pullorum</i> serum IX
<i>S. ent. var. essen</i> ant. IX, ?.	1 : 40 + geen voll. oph.
<i>S. typhi-murium</i> ant. IX, ? : g, o, m.	+ geen voll. oph.
<i>S. pullorum</i> antigeen IV, V, ? : i : 1, 2, 3,	—
(contrôles negatief).	

Uit deze agglutinaties blijkt dus dat de *S. typhi-murium* bacillen een agglutinine die eerst wel in het *S. pullorum*-serum zat er bij de verzadiging uit hebben kunnen halen, het vraagteken moet dus een aparte factor zijn; op grond van het fijnkorrelige type der agglutinatie en op grond van het feit dat *S. pullorum* geeselloos is, zal het een factor van het bacterie-lichaam moeten zijn, dus een zoogenaamd O-antigeen en voorgesteld moeten worden door een Romeinsch cijfer.

II. Een tweede proef werd verricht op geheel dezelfde wijze als de eerste, doch nu werd uitgegaan van *S. enteritidis var. essen* serum van de eend. Het eindresultaat was volkomen gelijk namelijk onverzadigd *S. enteritidis var. essen*-serum agglutineerde *S. enteritidis var. essen* bacillen (overwegend grofvlokkig), *S. pullorum* (fijn korrelig) en ook *S. typhi-murium* (fijn korrelig). Het zelfde eendenserum maar nu verzadigd met *S. typhi-murium* bacillen gaf wederom met *S. enteritidis var. essen* bacillen agglutinatie, ook met *S. pullorum*, doch nu niet meer met *S. typhi-murium*. *S. typhi-murium* is dus in staat gebleken uit *S. enteritidis var. essen* serum een deel der agglutinenen te binden.

Het omgekeerde moet nu ook aan te toonen zijn nl. dat *S. pullorum* en *S. enteritidis var. essen* een agglutinine uit *S. typhi-murium* serum kunnen binden. Dat dit zoo is, blijkt uit de onderstaande proef III, die verricht werd met *S. typhi-murium*serum bereid bij een konijn.

	verduunning van het <i>S. typhi-murium</i> serum IV, V, ? : i : 1, 2, 3		
<i>S. typhi-murium</i> antigeen IV, V, ? : i : 1, 2, 3.	1 : 50 +++ overwegend grofvlokkig voll. opheldering.	1 : 100 +++ overw. gr.vl. voll. opheldering.	1 : 200 +++ overw. gr.vl. voll. opheldering.
<i>S. ent. var. essen</i> ant. IX, ? : g, o, m.	+	+	666 +
	fijnkorrelig matige oph.	fijnkorrelig matige oph.	fijnkorrelig geringe oph.
<i>S. pullorum</i> antigeen IX, ?.	+	+	+
	fijnkorrelig matige oph.	fijnkorrelig matige oph.	fijnkorrelig matige oph.

Nu werd het *S. typhi-murium* serum verzadigd met *S. pullorum* bacillen, het resultaat was:

	verduunning van het verzadigde <i>S. typhi-murium</i> serum IV, V : i : 1, 2, 3.		
<i>S. typhi-murium</i> antigeen IV, V, ? : i : 1, 2, 3.	1 : 50 +++ overw. grofvl. voll. opheldering.	1 : 100 +++ overw. grofvl. voll. opheldering.	1 : 200 +++ overw. grofvl. voll. opheldering.
<i>S. ent. var. essen</i> ant. IX, ? : g, o, m.	—	—	—
<i>S. pullorum</i> antigeen IX, ?.	—	—	—

De *S. pullorum* bacillen hebben dus inderdaad een deel der *S. typhi-murium* agglutinenen gebonden. Een proef met *S. typhi-murium* serum verzadigd met *S. enteritidis var. essen* bacillen verliep tot in bijzonderheden net zoo. Al deze agglutinaties met elkaar hebben aangetoond, dat er een gemeenschappelijke lichaamsagglutinogeen factor moet zijn. Tot voor kort kende men 10 lichaamsagglutinogenen. Agglutinogen XI volgde door het vinden van de *S. aberdeen* (XI : i : 1, 2, 3) door *Smith*. (69) Daarna beschreef *Brill* (9) (1934) bij *S. abortus-equi*, waar alleen lichaamsantigeen IV bekend was nog een factor, die hij dus XII noemde. Onlangs beschreef *Kauffmann* (46) een gemeenschappelijk lichaamsantigeen van *S. paratyphi-B*, *S. typhi-*

murium en *S. stanley* eenerzijdsch en *S. typhi* en *S. enteritidis* anderzijdsch; hij noemde deze nieuwe antigeen factor, *Brill's* vondst misschien niet kennende, ook XII. Deze factor is echter niet dezelfde als de XII factor van *Brill*. De bij *S. pullorum* en *S. enteritidis* var. *essen* thans vastgestelde factor, die overeenkomt met de factor van *S. typhi-murium*, is zonder twijfel dezelfde als factor XII van *Kauffmann*, mijns inziens moet deze factor XIII genoemd worden daar *Brill* reeds cijfer XII voor *S. abortus-equi* in beslag genomen heeft. De agglutinogeenformule voor *S. pullorum* moet dus zijn IX, XIII en die voor *S. typhi-murium* IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3. Op grond van de waargenomen verschijnselen bij zeer vele agglutinaties werd de indruk verkregen, dat de XIII factor zwakker is dan de andere O factoren, ze is daardoor bij snelagglutinaties lang niet altijd waarneembaar, soms echter duidelijk, een enkele maal zeer duidelijk.

Onze verkregen kennis omtrent de antigeenstructuur van *S. typhi-murium* en *S. enteritidis* var. *essen* van de eend is dus thans zoo, dat wij als agglutinogeenformule moeten vaststellen IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3 en IX, XIII : *g, o, m*.

HOOFDSTUK V.

De biochemische eigenschappen van S. enteritidis var. *essen* en *S. typhi-murium*.

Thans moge volgen een en ander over de biochemische eigenschappen, vooral over de *S. enteritidis* var. *essen*, want daaruit blijkt, o.a. dat deze *Salmonella* van de eend als een aparte variëteit te beschouwen is.

De Dulcitolvergisting.

Behalve de antigene structuur werd ook de invloed op suikers en alcoholen nagegaan. De stammen „Eend I”, „Eend III”, „Eend IV”, „Eend V”, „J. E.”, „T. 653”, „T. 2066”, „T. 604”, „T. 652”, „T. 591” vergistten de lactose en de saccharose niet, de glucose, maltose, mannitol, xylose, arabinose snel, de dulcitol vertraagd. Behalve deze 10 werden nog 5 uit eendenkuikens gekweekte stammen op dulcitolomzetting onderzocht, eveneens „Jena 7” en „Jena 972”, „stam Erpel” en *S. enteritidis* var. *moscow*. De *S. enteritidis* var. *moscow* gaf op den 3en dag van bebroeding gasvorming, de in totaal 18 eendenstammen gaven

eveneens pas op den 3en dag of later gasvorming, alleen door zeer zwaar te enten, door bv. inplaats uit bouillon van een zwaargegroeide agarcultuur over te enten, kon gasvorming op den 2en dag geforceerd worden. Gedurende de eerste 24 uur werd echter nimmer gasvorming waargenomen. Daarentegen werd reeds 's morgens 9 uur gasvorming gezien in den vorigen avond 5 uur met *S. oranienburg*, *S. enteritidis*, *S. enteritidis* var. *dublin* (kalf) en *S. enteritidis* var. *dublin* (zilvervos) geënte buisjes.

Uit al het voorgaande blijkt dus, dat de *Salmonella enteritidis* van de eend:

- a. is niet een *S. enteritidis* var. *moscow*;
- b. heeft als antigeenstructuur IX, XIII : g, o, m;
- c. zet de dulcitol vertraagd om.

Onze bevindingen bevestigen dus die van *Boecker* en stonden tegenover de opvatting van *Hohn und Herrmann*, een opvatting, die zij evenwel ondertusschen zelf herzien hebben. (31) *Boecker* zegt: „Es handelte sich somit zweifellos um eine durch verzögerte Dulziterlegung charakterisierte Minusvariant des Typus enteritidis Gärtner-Jena.” Hiermede nu kunnen wij het toch niet geheel eens zijn. In de eerste plaats zij opgemerkt, dat al deze dulcitolvertraagde stammen afkomstig zijn van één diersoort: de eend (*Anas boscas*). De eendensalmonellose is als een op zichzelf staande ziekte te beschouwen met typische kenmerken (chronische oöphoritis bij de volwassen dieren, besmette eieren, acute eendenkuikenssterfte = morbus pullorum). Duitsche stammen van verschillende herkomst en Nederlandsche stammen van verschillende herkomst geven allen vertraagde dulcitolomzetting. Dit kan geen toeval zijn, ongetwijfeld is de vertraagde dulcitolomzetting een typische eigenschap van de *S. enteritidis* van de eend.

Op grond van het voorafgaande werd de *Salmonella enteritidis* van de eend dus als een nieuwe variëteit beschouwd.

Toen mijne bevindingen aan collega *Hohn* gemeld werden, antwoordde hij, tot dezelfde conclusie gekomen te zijn; het bleek ons dat wij beide een publicatie ingezonden hadden aan het Zentralblatt für Bakteriologie; *Hohn und Herrmann* publicatie (31), die het eerst was ontvangen, noemt deze nieuwe variëteit: *S. enteritidis* var. *essen*, zoodat de door mij genoemde naam (40) diende te vervallen. Het serologisch onderzoek werd

door *Hohn en Herrmann* niet zoo uitvoerig verricht als door mij; zij evenwel legden vooral den nadruk op het cultureel-biochemisch onderzoek. Behalve de reeds genoemde cultureel-biochemische eigenschappen werd door mij nogmaals een onderzoek ingesteld naar de dulcitolvergisting. Een groot aantal stammen werd geënt in gistingsbuisjes, welke peptonwater bevatten waaraan dulcitol was toegevoegd, gedurende een aantal dagen werd de gasproductie nagegaan.

In onderstaande tabel zijn steeds opgegeven hoeveel millimeter het vloeistofniveau in het blinde deel van het gistingsbuisje was gedaald. Uit deze cijfers blijkt, (het is gewoonte na 18 uur af te lezen) 1. dat alle *essen*-stammen dulcitol negatief zijn; 2. dat de later ontstane gasvorming der *essen*-stammen onderling zeer uiteenloopen kan.

Drie maanden later werden al deze stammen opnieuw op dezelfde wijze onderzocht. Ook nu weer waren na 18 uur alle positieve contrôles positief en alle negatieve contrôles negatief, de vier *S. typhi-murium*-stammen van de eend positief en de 25 Nederlandsche en 3 Duitsche *essen*-stammen negatief. Ook nu weer bleek, dat de later ontstane gasvorming der *essen*-stammen onderling zeer uiteen liepen, doch niet overeenkomstig de 1e proef, bv. de in de eerste proef (zie tabel) zeer dulcitoltrage stam T.1, die den 8en dag slechts 1 mM gas gevormd had, gaf bij de 2e proef den 4en dag reeds 35 mM, terwijl omgekeerd stam 877, die bij de 1e proef den 4en dag begon gas te vormen, bij de 2e proef tot en met den 8en dag nog nefatief was. Na iedere overenting is dus een veranderde dulcitoltraagheid mogelijk.

Voorts werd nog een onderzoek ingesteld volgens de methode van *Hohn en Herrmann* (32). Deze auteurs stellen zich op het standpunt, dat men de *Salmonella*-bacillen evenals als alle andere bacteriën dient te determineren volgens de cultureel-biochemische eigenschappen, of zooals zij zich uitdrukken, volgens het „Kulturtyp”, slechts in de 2e plaats, dus aanvullenderwijs, wordt de agglutinatatie voor determinatie gebruikt, wordt dus het „Serotyp” bepaald. *Hohn en Herrmann* gaan de werking van een *Salmonella* na op dextrose, arabinose, rhamnose en dulcitol. Dit wordt echter $2 \times$ gedaan, nl. 1. in een

Onderstaande *Salmonella* stammen werden van bouillon uit geënt
in dulcitolgistingsbuisjes 16. 9. '35.

De gasvorming is in millimeters opgegeven.

		17. 9. '35	18. 9. '35	19. 9. '35	20. 9. '35	21. 9. '35	23. 9. '35	24. 9. '35
<i>S. enteritidis</i> (Jena) (Gärtner 1892)		60	100	100	100	100	80	88
<i>S. ent. var. dublin</i> (zilvervos) . .	positieve	25	40	50	60	70	60	65
<i>S. abortus equi</i>	contrôles	12	50	70	80	100	100	85
<i>S. anatum</i>		60	100	100	100	100	80	88
<i>S. typhi murium</i> Eend VI . .	4 Nederlandsche <i>S. typhi-murium</i> stammen	12	60	80	100	100	80	88
" Eend VII . .		12	35	50	60	70	60	65
" Eend T III . .		1	10	20	25	30	30	35
" Eend T XI . .		5	25	40	50	60	60	65
<i>S. enteritidis. var. essen</i> 1066 .	25 Nederland- sche <i>S. enteritidis</i> <i>var. essen</i> stammen	—	—	?	5	10	10	10
" T 653		—	—	2	6	15	20	20
" E. T		—	—	—	?	3	3	3
" 712		—	—	?	5	10	10	10
" Eend IV		—	—	—	—	?	2	2
" Eend I		—	—	—	—	—	2	2
" 1650		—	—	—	?	2	2	2
" 652		—	—	5	10	15	25	30
" 1539		—	—	—	10	15	20	20
" 844		—	—	—	—	5	10	10
" 855		—	—	—	—	—	—	—
" 2066		—	—	—	—	?	2	2
" T 1		—	—	—	—	?	?	1
" 945		—	7	30	50	60	60	60
" Eend 111		—	—	20	30	40	60	60
" B. H.		—	—	5	10	15	20	20
" Mon		—	—	25	40	50	70	70
" J. E.		—	5	20	25	30	40	35
" 1369		—	—	—	—	—	—	—
" Hot		—	—	?	3	5	6	5
" 936		—	—	—	—	?	2	2
" 877		—	—	3	10	15	20	20
" Eend III		—	—	15	20	30	40	35
" Eend V		—	10	25	30	40	50	40
" T 591		—	—	—	?	3	3	4
" Erpel	3 Duitsche <i>S. enteritidis var.</i> <i>essen</i> stammen	—	—	2	20	30	35	35
" Jena 7		—	—	—	5	25	45	45
" Jena 972		—	—	22	35	50	80	80
<i>S. enteritidis var. chaco</i> 30 .	negatieve contrôles	—	—	2	10	15	15	15
" 300		—	—	—	?	2	2	2
" 397		—	—	—	5	6	6	10
" 470		—	—	15	20	25	25	25
<i>S. enteritidis var. moscou</i> . . .		—	—	—	5	10	15	15
<i>S. cholerae-suis</i>		—	—	—	—	—	—	10
<i>S. pullorum</i>		—	—	—	—	—	—	—

zeer armen voedingsbodem: Simmons-substraat, dat geen andere N-bron bevat dan $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ en 2. in een rijken voedingsbodem, nl. Hottingerbouillon. Dit laatste wordt bereid van stierentestikels, deze bouillon heeft vele voordeelen, zij is nl. rijk aan eiwitten en aminozuren en is tevens koolhydraatvrij. In het Simmons-substraat wordt de zuurvorming nagegaan, in den Hottingerbouillon de zuur- en gasvorming; bovendien wordt nog gebruikt een buisje Simmons-substraat met Na-citraat, waaruit al dan niet een basisch product ontstaat.

Hohn en Herrmann geven als eigenschappen van *S. typhi-murium* op:

Simmonssubstraat					Hottingerbouillon			
dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol	Na citraat	dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol
+	+	+	+	+	++	++	++	++

Hiermede bedoelen zij, dat in het algemeen dit de eigenschappen van *S. typhi-murium* zijn, *Herrmann* zelf wees reeds in 1929 op rhamnose-negatieve typen (28). De door mij volgens deze methode onderzochte *S. typhi-murium* stammen van eenden bleken zoowel in de Simmons-substraat als in den Hottingerbouillon rhamnose-negatief te zijn. Ook bleek mij, dat de *S. typhi-murium* door *van Dorssen* geïsoleerd uit een zeemeeuw (14) eveneens rhamnose-negatief was. In dit verband is het wellicht nuttig op te merken, dat wilde meeuwen dikwijls azen op eendenfarms; merkwaardig is voorts, dat een stam door *van Dorssen* geïsoleerd uit een rat, afkomstig van een diergaarde, welke rat dood gevonden was in de onmiddellijke nabijheid van den vijver met eenden en ander watergevogelte, eveneens rhamnose-negatief bleek te zijn. 15 andere *S. typhi-murium*-stammen (o.a. van een kanarie, kat, muizen en duiven), waarvan sommige stammen op de Simmons-substraatbuisjes afwijkingen gaven, waarover hier niet verder uitgeweid kan worden, waren in den Hottingerbouillon allen rhamnose-positief.

De *S. enteritidis* var. *essen*-stammen werden ook allen volgens dit systeem onderzocht, waarbij wederom het dulcitol-negatieve karakter bleek; bovendien is de *S. enteritidis* var.

essen nog gekenmerkt door het arabinose-negatief zijn op de Simmons-substraat.

Tenslotte werd nog van alle eendenstammen de reactie in glycerine-bouillon (Stern) nagegaan. Deze reactie was steeds positief, waarbij opgemerkt werd, dat de reactie der *essen*-stammen steeds sneller positief wordt dan die der *S. typhi-murium* stammen.

HOOFDSTUK VI.

Salmonellose bij den mensch, afkomstig van de eend.

Uit de literatuur is gebleken, dat zoowel de *S. typhi-murium* van de eend als de *S. enteritidis* var. *essen* van de eend ziektegevallen bij den mensch heeft veroorzaakt. Het betreft hier nagenoeg uitsluitend voedselvergiftigingen, doordat eieren gebruikt werden bij de bereiding der spijsen. Een groot percentage der personen, dat van dergelijk voedsel nuttigde, werd ziek, het klinische ziektebeeld was dat van voedselvergiftiging (zie de in het literatuuroverzicht genoemde symptomen volgens *Seligmann* en de overige daarop betrekking hebbende literatuur).

De ziektegevallen blijven echter vrijwel beperkt tot die personen, die van de besmette spijs aten. Een endemie of epidemie volgt hierop niet. Alhoewel dergelijke voedselvergiftigingspatiënten kunnen sterven, herstellen de meesten. De diagnose „voedselvergiftiging afkomstig van de eend” is zeker als bij dergelijke gevallen wordt aangetoond *S. enteritidis* var. *essen* dus een „*enteritidis*” *Salmonella*: IX, XIII : *g, o, m*, met als typeerende eigenschap trage dulcitolvergisting of *S. typhi-murium* IV, V, XIII : *i* : 1, 2, 3, met als typeerende eigenschap het rhamnose negatief zijn, terwijl de anamnese het gebruik van eendeneieren vermeldt en dan nagespoord kan worden dat het bedrijf, waarvan de eieren afkomstig waren, besmet is met één of twee der genoemde *Salmonella*'s.

In Nederland werd in 1935 een geval van voedselvergiftiging bij den mensch vermeld door *Clarenburg en Pot* (12) veroorzaakt door met „*Aertrijcke type*” besmette eendeneieren. (Of rhamnose door deze *S. typhi-murium* al dan niet werd vergist, werd niet vermeld.)

Hoe de eieren besmet geraken en hoe de mensch beveiligd kan worden tegen dergelijke voedselvergiftigingen moge thans volgen.

HOOFDSTUK VII.

Salmonellose bij de eend.

De *S. typhi-murium* en de *S. enteritidis* var. *essen* infectie van de eend komen klinisch zoo zeer overeen, dat ze gelijktijdig besproken kunnen worden. De eendensalmonellose is in hoofdzaak gekenmerkt door de volgende infectiecyclus. De chronisch zieke volwassen eend is dikwijls lijdende aan een ontsteking van het ovarium (vogels hebben slechts één ovarium, alleen de linker gonade heeft zich ontwikkeld). Indien een oöphoritis bestaat, kunnen de eifollikels (dus wat later de eidooier is) *Salmonella*'s bevatten. Een dergelijke eend kan dus besmette eieren leggen, worden die eieren bebroed, dan bestaan de volgende mogelijkheden:

a. door de infectie sterft het embryo.

b. De kuikens komen reeds ziek ter wereld, zoodat onmiddellijk na het uitkomen groote acute sterfte optreedt. Een ziek geboren kuiken heeft in den regel geen normale stofwisseling tijdens het embryonale leven gehad, waardoor de dooiermassa niet volledig geresorbeerd is, die kuikens hebben dus een te groote dooierrest, wat tijdens het leven dan te bemerken is aan het te dikke buikje van het kuiken. (Het is dan ook een zeer goede maatregel der eendenfokkers, dat bij de geslachtsbepaling alle „dikbuikjes” gedood worden. In tegenstelling met hennetjes en haantjes is bij eendjes en woerdjes reeds den eersten dag het geslacht te bepalen. Onmiddellijk na de geboorte worden dus alle diertjes onderzocht; de woerdjes worden opgeruimd). De kuikens krijgen diarrhee en verspreiden met de faeces de smetstof, die opgenomen kan worden door gezond geboren kuikens. Deze laatsten worden ook ziek, krijgen eveneens diarrhee, doch hebben een goed geresorbeerde dooierrest. Daar in den handel veel eendagskuikens worden verkocht, is dus de dooierrest een zeer belangrijk punt bij de diagnose en de antidateering. De zieke kuikens sterven aan septicaemie, uit alle organen en uit de faeces is *Salmonella* te kweken. De overlevenden groeien op tot schijnbaar gezonde dieren, doch als ze volwassen geworden zijn, is de kans groot dat zich een oöphoritis heeft ontwikkeld; bij woerden kan orchitis ontstaan.

Uit een en ander blijkt dus de voorkeur van *S. typhi-murium* en *S. enteritidis* var. *essen* voor het geslachtsapparaat van de

eend. Dit is in het geheel niet bevreemdend, want vele *Salmonella*'s hebben de neiging het genitaal apparaat aan te tasten. Van Dorssen wees hier ook reeds op. (15) Wij kennen namelijk: *S. abortus-equi*, die bij het paard de verwekker is van de infectieuze abortus, in vroeger jaren kwam deze ziekte in ons land zeer veel voor. Voorts is bekend *S. abortus-ovis*, dit is de verwekker van de infectieuze abortus bij het schaap; ook abortus bij het konijn, door *Salmonellose*, is beschreven. Bovendien werd onlangs door Bernard (4) een nieuw *Salmonella* type vermeld als oorzaak van abortus bij het rund. (Infectieuze abortus bij het rund zou dus behalve door *Brucella Bang*, trichomonaden, schimmels enz. ook door *Salmonellose* veroorzaakt kunnen worden.) *S. pullorum*, de verwekker der in ons land zeer bekende kippenziekte: „*morbis pullorum*” kenmerkt zich door oöphoritis bij de kip met als gevolg besmette eieren en dus kuikensterfte, bij den haan komt orchitis voor; ook bij de duif bestaat deze localisatie, hier is het *S. typhi-murium* die oöphoritis kan geven met als gevolg besmette eieren, en dus kans op voedselvergiftiging bij den mensch (11); de doffer kan volgens van Dorssen aan orchitis lijden. (15) Ook bij kanarievogels is *S. typhi-murium* uit het ovarium gekweekt. (19) Tenslotte zij hier nog aan toegevoegd dat een *S. enteritidis* var. *essen* uit een eend, ingespoten bij een kip uit het ovarium terug te kweken was. (41).

Uit het voorgaande blijkt dus de belangrijkheid van het eendenei.

Het eendenei.

In ons land worden zeer veel eenden gehouden, er zijn zelfs farms met duizenden dieren, een der grootste b.v. telt bijna 20000 eenden. Het productievermogen van een eend is zeer groot, groter dan van een kip, een „record eend” b.v. heeft 426 dagen onafgebroken elken dag een ei gelegd. De eenden-eierenproductie in ons land is dus zeer belangrijk. Een groot aantal eieren wordt uitgevoerd o.a. naar Duitschland, vooral naar het Ruhrgebied, waar ze veel, dikwijls in rauwen toestand, door de arbeidersbevolking gegeten wordt. Sinds kort moet in Duitschland elk eendenei van een stempel voorzien zijn dat koken voorschrijft. In ons land is het eendeneierengebruik in het huisgezin gering, doch de banketbakkers verwerken wel eendeneieren. Deze eieren kunnen op de volgende wijze besmet geraken.

a. De volwassen eend lijdende aan oöphoritis vormt een besmette follikel, het ei dat daarvan ontstaat, bevat dus *Salmonella*. (Dit is ongetwijfeld een der voornaamste oorzaken van besmette eieren.)

b. Op het slijmvlies van de eileider is *Salmonella* aange-toond kunnen worden; tijdens de vorming van het eiwit, de vliezen en dop, wat in deze eileider geschiedt, kan dus het ei besmet geraken.

c. Het darmkanaal (faeces) kan *S.* bevatten, als dus het ei via de cloaca gelegd wordt, is besmetting van de eioppervlakte en indringen van bacillen naar binnen mogelijk.

d. Een *Salmonella* vrij ei kan in het legnest bezoedeld worden door een andere besmette eend.

e. Voorts bestaat nog de theoretische mogelijkheid dat een gezonde eend bevrucht wordt door een besmetten woerd, zoodat infectieus sperma het ei kan infecteeren.

f. Tenslotte is vooral voor de fokkers en broeders van belang dat de broedmachine niet besmet is. Een besmette broedmachine kan de gezond ingelegde eieren infecteeren.

Om te onderzoeken of een ei besmet is, onderzoekte men 1e. het vuil op de schaal; 2e. het ei zelf. De methode, die mij voor het laatste goed voldeed, is: het ei 1 à 2 weken in de broedkamer plaatsen om de bacillen gelegenheid te geven zich te vermeerderen, daarna wordt een flinke hoeveelheid ei-inhoud met een pipet overgebracht in een kolfje bouillon en in een kolfje bouillon volgens *Müller*. Het blijkt dan dat men slechts uit een gedeelte van het aantal gelegde eieren van een positieve eend een *Salmonella* kan aantoonen. Voorts bleek mij (43) dat men bij eenden, nl. als de agglutinatietiter van het bloedserum zeer hoog is, soms met eidooier een agglutinatatie kan verrichten. Neemt men 1 druppel *Salmonella* antigeen dat $75 \times$ de dikte heeft van buisje 1 van de Nephelometer van *Mac Farland* (47) gekleurd met crystalviolet en men vermengt dit met 1 druppel dooier, dan ziet men bij negatieve dieren geen agglutinatatie, bij sterk positieve dieren soms macroscopisch waarneembaar, een uitvlokking. Agglutinenen zijn dan dus in de dooier terecht gekomen (het eiwit is negatief), zoowel bij *S. typhi-murium* als bij *S. enteritidis* var. *essen* is mij dit gelukt (43), de meeste eieren van positieve eenden reageeren echter negatief. Ziet men echter een positieve dooieragglutinatatie, dan is het zeker dat het ei van

een besmette eend afkomstig is, alhoewel het nog niet bacillen behoeft te bevatten. Bij eieren van kippen lijdende aan *morbus pullorum* werd deze dooieragglutinatie reeds door Paille (54) vermeld.

De kuikenssterfte. (41)

Hierover werden reeds eenige opmerkingen gemaakt. De volgende gevallen geven een idee over de kuikenssterfte en het onderzoek daarvan.

1. Inzender A.

Anamnese: op het bedrijf is van te voren nimmer sterfte geweest. De eerste weken na het uitkomen der eieren hebben zich geen ziektegevallen voorgedaan. Thans nu de eendenkuikens enkele weken oud zijn, sterven er velen accuut, op 1 dag zelfs 40 stuks van de 270. Een oorzaak is niet op te geven.

Sectiebevindingen: Enteritis. Overigens geen afwijkingen (geen slecht geresorbeerde dooierresten te vinden).

Bacteriologisch onderzoek: Uit deze eendjes werd *S. enteritidis* var. *essen* geïsoleerd.

De sterfte kwam spontaan tot stilstand.

Conclusie: Het betreft hier kuikens, die pas eenige weken na de geboorte accuut sterven. Het ligt dus voor de hand, dat de *S. enteritidis* var. *essen* infectie niet al reeds in of op het ei aanwezig was, doch later van buiten af is ontstaan. Een onderzoek op het bedrijf leverde geen verdere resultaten op.

2. Inzender B.

Anamnese: Sterfte bij enkele dagen oude eendenkuikens.

Sectiebevindingen: geen vuile cloaca, geen slecht geresorbeerde dooierresten, geen hardjes in de organen, geen duidelijke enteritis, sterk geel gekleurde lever.

Bacteriologisch onderzoek: Uit hart, lever en dooierrest werd *S. enteritidis* var. *essen* gekweekt.

3. Inzender B.

Anamnese: Sterfte bij pas geboren eendenkuikens.

Sectiebevindingen: geen vuile cloaca, slecht geresorbeerde dooierrest, geen hardjes in de organen, lever geel en gedegeneerd.

Bacteriologisch onderzoek: Uit hart, lever en dooierrest werd *S. typhimurium* gekweekt.

4. Inzender B.

Anamnese: Sterfte onder jonge eendenkuikens.

Sectiebevindingen: geen der 19 ingezonden diertjes heeft een vuile cloaca, kleine of geen dooierresten, nergens hardjes of andere afwijkingen.

Bacteriologisch onderzoek: Uit hart, lever en dooierrest (voor zoover aanwezig) werd geënt. Bij 16 kuikens werd een reincultuur verkregen, die een positieve snelagglutinatie gaf, met *S. typhimurium* serum. Een der culturen werd uitvoerig als *S. typhimurium* gedetermineerd.

Uit de gevallen 2, 3 en 4 blijkt dus, dat op het bedrijf van B zoowel sterfte door *S. enteritidis* var. *essen* als door *S. typhi-murium* heerschte. Ter plaatse werd een onderzoek ingesteld. Allereerst werd alles onderzocht, wat aan de dieren (jong en oud) verstrekt werd. Hiervoor werd 'steriel verzameld mais, grit, Engelsch vischmeel, opfokvoer, garnalen, scholmeel, gemalen puf (vischafval) en water. Van elk dezer monsters werd een kolfje met 100 cc. voedingsbodem volgens Müller geënt (dit is een voedingsbodem, waarin *Salmonella* wel, andere bacillen niet of slecht groeien); niettegenstaande een uitvoerig voortgezet bacteriologisch onderzoek kon geen *Salmonella* gekweekt worden. Bij de volwassen eenden van het bedrijf gelukte het door middel van bloedonderzoek (agglutinatie) aan te toonen, dat een zeker percentage der dieren deels met *S. typhi-murium*, deels met *S. enteritidis* var. *essen* besmet was.

Conclusie: De *Salmonella* infectie op het bedrijf B is hier via het ei ontstaan.

4. Inzender C.

Anamnese: Sterfte onder pas geboren eendenkuikens. $3\frac{1}{2}$ dag na de geboorte zijn reeds 70 van de 260 gestorven.

Sectiebevindingen: slecht geresorbeerde dooierresten.

Bacteriologisch onderzoek: *S. enteritidis* var. *essen* werd gekweekt.

Conclusie: Een onderzoek ter plaatse kon niet worden ingesteld. De slecht geresorbeerde dooierresten en het ontstaan der sterfte direct na de geboorte doen zeer sterk de infectie via het ei vermoeden.

Van belang is nog het volgende geval:

Kippenkuikenssterfte door S. enteritidis var. *essen*.

Op het terrein van het instituut arriveerden eenige pas geboren kippenkuikens, die uitgebroed waren op een bedrijf waar eenden, vermoedelijk besmet met *Salmonella*, werden gehouden. Reeds direct na aankomst waren deze kuikens niet gezond, enkele stierven. Drie kuikens werden onderzocht. Zij hadden allen een cementcloaca en een zeer groote dooierrest. *S. pullorum* werd uit geen der 3 geïsoleerd, echter wel uit een der kuikentjes *S. enteritidis* var. *essen*. Dit geval doet wel zeer sterk vermoeden dat het hier ook een ei-infectie betreft. Hierbij zij op het volgende gewezen: niet alleen gelukte het mij kippenkuikens per os met *S. enteritidis* var. *essen* van de eend te infecteeren, doch ook een volwassen kip was te besmetten (intramusculair); dit dier kreeg een sterk positieve agglutinatiter; bij sectie van deze kip werd door van Dorssen *S. enteritidis* var. *essen* uit het ovarium gekweekt. Het vermoeden is dus zeer zeker gewettigd, dat ook kippenkuikens aan *Salmonella*-infectie via het ei en daarna ook door contactinfectie van kuiken op kuiken ziek kunnen worden en dat ook het kippenei, evenals het

eendenei, *Salmonella* kan bevatten. *Bij voedselvergiftigingen door S. enteritidis var. essen bij den mensch denke men dus niet uitsluitend aan de eend, doch ook aan de kip.*

Behalve gevallen van kuikensterfte als hierboven genoemd zijn, werd ook eenige malen acute sterfte van reeds wat oudere dieren waargenomen. Deze jonge eenden bleken dan gestorven te zijn aan septicaemie, uit alle organen werd dan *Salmonella* gekweekt.

Salmonellose bij de volwassen eend.

De volwassen eend is in den regel chronisch lijdend. Een der voornaamste orgaanafwijkingen hierbij is oöphoritis. Het komt echter voor dat bij een positieve eend geen oöphoritis wordt waargenomen, terwijl omgekeerd niet iedere oöphoritis door *Salmonella* infectie veroorzaakt behoeft te zijn. Indien een oöphoritis gezien wordt waarbij de eifollikels een inhoud hebben die te visceus, deegachtig of verhard geworden is, dan is de verdenking op *Salmonella* infectie zeer groot. Gaat men uit het cadaver enten, dan ente men natuurlijk zeker ook uit het ovarium, het is dan van belang vrijwel alle ovariumfollikels in voedingsbodems over te brengen, teneinde een zoo groot mogelijke kans op het kweken van *Salmonella* te hebben. Behalve het ovarium kunnen ook andere organen aangetast worden, zoodat ook bij de volwassen eend de mogelijkheid bestaat dat de bacil gekweekt wordt uit de parenchymenteuze organen, beenmerg, darmen, faeces, salpinxslim enz. Ziet men een of andere afwijking, dan ente men daar ook zeker uit. Zoo werd b.v. door mij een arthritis van de articulatio cubiti gezien. Uit de synovia werd *S. enteritidis var. essen* (38) gekweekt. (Deze localisatie: gewrichtssalmonellose, komt bij duiven zeer veel voor, zoo zeer zelfs, dat iedere duif met verdikt gewricht zeer verdacht is van *Salmonellose*.) Uit verschillende eenden met positieve agglutinatatie gelukt het niet *Salmonella* te kweken, men heeft dan bij het enten juist de localisatie mis geloopt. Negatieve kweekproeven bewijzen dus geenszins dat de eend *Salmonellose* vrij was. De oöphoritis kan oorzaak zijn van het feit dat abnormale follikels los gelaten worden van het ovarium, zoodat deze los in de buikholte terecht komen en daar aan buikwand of buikorganen gaan verkleven, het is mogelijk dat hierdoor meer of minder uitgebreide peritonitis met meer of minder vochtvorming ontstaat. Eenden met een hangbuik zijn daarom verdacht van

Salmonellose. Wil men de diagnose bij de eend tijdens het leven stellen, dan kan men onderzoeken:

a. de eieren, b. de faeces, c. het salpinxsljm, door er uit te kweken, en d. het bloed door agglutinatatie te verrichten. Dit laatste is zeer belangrijk en werd als volgt uitgewerkt.

Agglutinatatie:

In 1934 (21) werd door mij de aandacht gevestigd op de agglutinatorische verwantschap van *S. pullorum* en *S. enteritidis* var. *essen*; *S. gallinarum*serum bleek *S. enteritidis* var. *essen* te agglutineeren; serum van een kip lijdende aan chronische *morbis pullorum*, agglutineerde eveneens *S. enteritidis* var. *essen*. Omgekeerd agglutineerde *S. enteritidis* var. *essen*serum *S. pullorum*. Ook bij de bloeddruppelmethode bleek dit zoo te zijn; van een kip, lijdende aan chronische *morbis pullorum* werd 1 öse bloed gemengd met 1 druppel *S. enteritidis* var. *essen* antigeen; de positieve reactie was bijna even sterk als die met *S. pullorum* antigeen. Van 13 kippen (10 lijdende aan chronische *morbis pullorum* en 3 gezonde) werden met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen duidelijk de 10 zieke kippen onderkend. Vandaar dat ik toen schreef, dat „bijna zeker” een troep eenden besmet met *S. enteritidis* var. *essen* te onderzoeken moest zijn met *S. pullorum* antigeen. Dit vermoeden berustte bovendien nog op het feit, dat een kunstmatig besmette eend inderdaad een fraaie positieve bloeddruppel agglutinatatie had gegeven met *S. pullorum* antigeen. Zelfs was de reactie met *S. pullorum* antigeen nog duidelijker, dan die met antigeen van den voor besmetting gebruikten *S. enteritidis* var. *essen* stam. Dit laatste meende ik te moeten verklaren door het sterk agglutinabel zijn van den reeds jaren daarom opzettelijk gebruikten *S. pullorum* stam. Mijn eindconclusie was toen: „vindt men dus op een eendenbedrijf een *S. enteritidis* var. *essen* infectie, dan zal men *S. pullorum* antigeen of *S. enteritidis* var. *essen* antigeen moeten nemen.”

Dat dit alles zoo is, behoeft geen verwondering te verwekken, als men bedenkt, dat vooral bij chronische zieke individuen, besmet met *Salmonella*, de O-(lichaams)-agglutinenen overheerschen. De lichaamsagglutinenen bij *S. pullorum* en *S. enteritidis* var. *essen* zijn gelijk, zij hebben namelijk beide de factoren IX en XIII. (Zie ook (1) en (2).)

Experimenteel is, zooals uit het volgende zal blijken, aangetoond, dat het *S. pullorum* antigeen een duidelijke reactie geeft

bij de snelmethode en de bloedruppelmethode bij met *S. enteritidis* var. *essen* geïnfecteerde dieren. Meermalen treedt de reactie met *S. pullorum* antigeen zelfs sneller en duidelijker op dan die met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen.

Borcila (8) heeft dit ook opgemerkt nl. kippen besmet met „*Gärtner Bakterien*” gaven beter agglutinatie met *S. pullorum* antigeen dan met het bijbehorende „*Gärtner*” antigeen. *Hole* (33) merkte dit eveneens op bij „*enteritidis*” infectie bij eenden. Deze auteurs is evenwel de praktische toepassing ervan ontgaan.

De volgende experimenten werden verricht.

Proeven bij vogels.

1. 100 kippen van een bedrijf, vrij van *morbus pullorum*, werden volgens de snelmethode onderzocht, zoowel met *S. pullorum* als met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen. Geen der reacties verliep positief.

2. 16 kippen, lijdende aan chronische *morbus pullorum*, 2 gezonde kippen (17 en 18) en 1 gezonde eend (19) werden volgens de snelmethode onderzocht met *S. enteritidis* var. *essen* en *S. pullorum* antigeen in 3 verdunningen (1 : 25, 1 : 50, en 1 : 100).

De resultaten, die nu volgen, zijn aangeduid met +++ (sterk positief); ++ (duidelijk positief); + (zwak positief); ? dubieus); — negatief).

[illegible]

Als contrôle werden al deze sera ook ingezet met *Brucella abortus* antigeen, doch geen enkele agglutinatatie werd waargenomen, alhoewel dit antigeen met positief runderserum (abortus) een duidelijke agglutinatatie gaf. Bovendien werden eenige sera 30 minuten op 57° C verhit en daarna wederom voor agglutinatatie gebruikt, de resultaten bleven ongewijzigd. Spontane eigen uitvlokking of normaalagglutinininen zijn dus hier niet in het spel geweest.

Het *S. pullorum*-antigeen gaf hier dus gelijke of iets betere resultaten.

s. Dezelfde kippen als van proef b. gaven de volgende bloeddruppelreacties:

	<i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i> antigeen.	<i>S. pullorum</i> antigeen
1.	+	+
2.	+	+
3.	+	+
5.	+	+
5.	+	+
6.	+	+
7.	+	+
8.	+	+
9.	+	+
10.	+	+
11.	?	+
13.	+	+
14.	+	+
16.	+	+
17.	—	—
18.	—	—

Ook nu stemde het resultaat van *S. pullorum* antigeen overeen met dat van *S. enteritidis* var. *essen* antigeen; de vlokken met het *S. pullorum* antigeen waren nu en dan grooter en meer compact. De druppels met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen gaven soms iets uitvlokking van roode bloedlichaampjes.

Proeven bij eenden.

4. Bij een door mij verricht onderzoek van 66 eendenbloed-monsters werd reeds de indruk verkregen, dat *S. enteritidis* var. *essen* met *S. pullorum* antigeen aan te toonen is. Dit kon nader nagegaan worden bij 96 monsters eendenserum, welke van een

collega ontvangen werden, die een partij eenden had onderzocht volgens de snelserummethode; een groot aantal positieve, met opzettelijk een aantal negatieve sera werden aan mij afgestaan. Hierbij bleek, dat zoowel het *S. pullorum*- als het *S. enteritidis* var. *essen* antigeen dezelfde dieren of als positief of als negatief aanmerkten, slechts nu en dan was er een zeer dubieuze reactie of alleen met *S. pullorum*- of alleen met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen. Dikwijls was de reactie met *S. pullorum* antigeen duidelijker.

Een onderzoek van een 2e partij (36 monsters eendenserum) verliep evenzoo. In totaal werden dus 198 serummonsters van eenden onderzocht.

(Om vergissingen door eventueele normaalagglutinenen uit te schakelen, werden deze sera $\frac{1}{2}$ uur op 56° C. verhit; de resultaten bleven gelijk, alleen was de reactie over de geheele linie iets zwakker, hetgeen overeen stemt met wat Gardner in 1928 reeds mededeelde nl. dat de titers door de verhitting op 56° C iets dalen.) (25).

Op grond hiervan en mede naar aanleiding van de andere genoemde en nog te noemen proeven werd bovenbedoelde collega geadviseerd met *S. pullorum* antigeen te werken; thans zijn reeds tienduizenden eenden met *S. pullorum* antigeen onderzocht.

Het bleek dat bij de bloeddruppelmethode met *S. pullorum* antigeen bij eenden, besmet met *S. enteritidis* var. *essen*, vooral als het antigeen versch is, bijna steeds een hinderlijke uitvlokking van roode bloedlichaampjes ontstaat, die het aflezen der reactie bemoeilijkt. Bij *S. pullorum* antigeen, eveneens bereid door het te dooden met formol, ontstaat deze roode bloedlichaampjes agglutinatie niet. Als men met *S. pullorum* antigeen kan werken, ontloopt men dus de genoemde storing. Een verschil tusschen het *S. pullorum* antigeen en het *S. enteritidis* var. *essen* antigeen is, dat alleen het laatste geesels bevat. Deze geesels zijn te vernietigen door het antigeen te verhitten. Of nu die geesels de oorzaak van de uitvlokking der roode bloedlichaampjes zijn, is niet bewezen, doch het bleek inderdaad zoo te zijn dat bij verhit antigeen de roode bloedlichaampjes uitvlokking uitbleef.

5. Een goed inzicht hiervan geeft de volgende proef. Genomen werden 17 eenden, waarvoor de volgende antigenen be-

reid werden: (achter den naam volgt de antigeenformule, daarna de bereiding). (Dus antigenen, die allen gelijk zijn wat O antigeen betreft.)

S. pullorum (IX, XIII) (formol).

S. enteritidis (Jena) (IX, XIII : g, o, m,) (formol).

S. enteritidis (Jena) (IX, XIII : g, o, m,) (verhit).

S. enteritidis var. *essen* (eend IV) (IX, XIII : g, o, m) (formol)

S. enteritidis var. *essen* (eend IV) (IX, XIII : g, o, m,) (verhit)

S. enteritidis var. *essen* (eend V) (IX, XIII : g, o, m,) (formol)

S. enteritidis var. *essen* (eend V) (IX, XIII : g, o, m,) (verhit).

S. enteritidis var. *danyasz* (IX, XIII : g, o, m,) (formol).

S. enteritidis var. *danyasz* (IX, XIII : g, o, m,) (verhit).

Het resultaat was:

	<i>S. pullorum</i> formol	<i>S. enteritidis</i> Jena		<i>S. ent. var. v. es.</i> eend IV		<i>S. ent. var. v. es.</i> eend V		<i>S. ent. var.</i> <i>danyasz.</i>	
		form.	verhit	form.	verhit	form.	verhit	form.	verhit
Woerd	++	—	?	+	—	+	+	—	+
Eend 0062	—	r—	—	r—	—	r—	—	—	—
Eend 28	—	r—	—	r—	—	r—	—	—	—
Eend 51	—	—	—	r—	—	r—	—	—	—
Eend 936	+	r—	+	r—	—	r—	?	?	?
Eend 227	?	r—	?	r	?	r—	?	—	?
Eend 116	?	r—	—	r	—	r—	—	—	?
Eend 136	—	r—	—	r	—	r—	—	—	—
Woerd 9	—	r—	—	r	—	r—	—	—	—
Eend 1006	++	r++	++	r++	++	r++	++	r++	+
Eend 855	+	r+	?	r+	—	r+	—	r+	—
Eend 712	+++	r+++	+++	r+++	+++	r+++	+++	r+	++
Eend 877	++	r+	++	r+	+	r+	+	r+	+
Eend 945	+++	r++	+++	r++	+	r+	++	+	++
Eend 111	—	r—	—	r—	—	—	—	—	—
Woerd 6615	—	r—	—	r—	—	—	—	—	—
Eend 1560	+++	r+++	++	r++	++	r++	++	r++	+++

(r = agglutinatie van roode bloedlichaampjes).

Uit bovenstaande tabel van 17 eenden blijkt:

a. dat bij agglutinaties met verhitte antigenen geen storende roode bloedlichaampjes agglutinatie ontstaat;

b. dat van de formol antigenen alleen het *S. pullorum* antigeen geen storende roode bloedlichaampjes agglutinatie geeft;

c. dat de agglutinaties met *S. pullorum* antigeen geenszins ten achter staan bij alle *S. enteritidis* agglutinaties.

6. Deze agglutinatie van roode bloedlichaampjes werd ook nagegaan bij kippen.

	<i>S. pullorum</i> antigeen formol	<i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i> antigeen eend IV formol	<i>S. ent. var. essen</i> antigeen eend V verhit
Gezonde kip	—	r	—
Gezonde kip	—	r	—
Kip 235	+++	r+++	++
Kip 188	+++	r+++	++
Kip geen nummer	+++	r++	+++
Kip 795	+	r+	+
Kip 34	+	r+	+
Kip geen nummer	+++	r+++	+++
Kip 137	+++	r+++	+++
Kip 35	++	r++	+
Kip 37	+++	r+++	++
Kip 44	+++	r++	++
Kip 40	++	+	+
Levend ingez. patient	+++	r+++	++

Het resultaat komt dus geheel overeen met dat van de vorige proef.

7. Voorts werden 23 gezonde duiven onderzocht; bij geen der 23 werd de roode bloedlichaampjesuitvloeking gezien met *S. pullorum* antigeen formol, evenmin met *S. enteritidis* var. *essen* (eend V-antigeen) verhit; daarentegen wel bij alle 23 met *S. enteritidis* var. *essen* antigeen (Eend IV) formol.

8. Vermeld moge nog worden het resultaat van een nauwkeurig onderzoek van de laatste 13 dieren van proef 5. Dit onderzoek, dat eenige weken na de proef verricht werd, bewijst nog eens de agglutinatorische verwantschap van *S. enteritidis* var. *essen* en *S. pullorum*. Bovendien werd dit onderzoek gedaan om uit te maken of geringe reacties als positief te beschouwen zijn. Eenden uit onbesmette omgeving geven een negatieve reactie; dienen nu dieren als eend 227, eend 116, eend 136, woerd 9, eend 111 en eend 6615, die soms dubieus reageerden (serummethode) dan weer eens nagenoeg negatief waren om daarna weer iets reactie te geven, uit de toom verwijderd te worden?

(D = *S. enteritidis* var. *essen* antigeen; P = *pullorum* antigeen; B = *S. typhi-murium* antigeen).

Eend 936. Bloeddruppelaggl. : P +, D +, B —.

Snelserummethode:

P:	++	++	+	+	+
D:	+	+	?	?	?
B:	—	—	—	—	—

Sectie: ovarium in volle productie. Enkele afwijkende follikels. *S. enteritidis* var. *essen* werd gekweekt uit milt, ovarium en abnormale follikel (bij het laatste bringe men vooral den follikelwand in den voedingsbodem).

Eend 227. Bloeddruppelaggl.: P + zwak; D —; B —.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+	—	—	—	—
D:	?	—	—	—	—
B:	—	—	—	—	—

Sectie: abnormaal ovarium.

Niettegenstaande zeer uitvoerig enten alles steriel gebleven.

Eend 116. Bloeddruppelaggl.: P. —; D. —; B. —.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	++	+	?	—	—
D:	+	?	?	—	—
B:	—	—	—	—	—

Sectie: geheel negatief. Alle cultures steriel gebleven.

Eend 136. Bloeddruppelaggl.: P. ++; D. —; B. —.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+++	+++	++	+	?
D:	++	++	++	+	?
B:	—	—	—	—	—

(Deze eend werd van een bedrijf betrokken op grond van zijn zeer geringe, dubieus positieve serumreactie; de bloeddruppel (zie proef 5) was aanvankelijk negatief.)

Sectie: geheel normaal. Uit het oogenschijnlijk normale ovarium werd *S. enteritidis* var. *essen* gekweekt.

Woerd 9. Behalve een dubieuze serumreactie P : 1 : 25 en zeer dubieuze serumreactie D : 1 : 25 alles negatief.

Eend 1006. Bloeddruppelaggl. : P. ++; D +; B. —.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+++	+++	+++	++	?
D:	++	++	++	+	?
B:	—	—	—	—	—

Sectie: oöphoritis. *S. enteritidis* var. *essen* werd geïsoleerd uit het ovarium en alle abnormale follikels.

Eend 712. Bloeddruppelagglut.: P: +++; D: +++; B: +.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+	++	+++	+++	++
D:	+++	+++	+++	+++	++
B:	?	?	?	?	?

Sectie: peritonitis, oöphoritis.

S. enteritidis var. *essen* werd geïsoleerd uit het ovarium en uit 2 abnormale follikels.

Eend 855. Bloeddruppelaggl. : P : + (zeer zwak); D : + (zwak); B:—.

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	++	++	+	?	—
D:	+	+	+	+	?
B:	?	—	—	—	—

Sectie: een kleine te roode eifollikel.

S. enteritidis var. *essen* werd geïsoleerd uit het ovarium en het abnormale follikeltje. Ook werd de bacil gekweekt uit een tijdens het leven gelegd ei.

Eend 877. Bloeddruppelaggl. : P : + ; D : + ; B : — .

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+	++	+++	+++	+++
D:	++	+++	+++	+++	+++

Sectie: oöphoritis. *S. enteritidis* var. *essen* werd geïsoleerd uit abnormale eifollikels.

Eend 945. *S. enteritidis* var. *essen* geïsoleerd uit ovarium en milt.

Eend 111. Bloeddruppelaggl.: P : + ; D : + (iets sneller en duidelijker); B : —.

Snelserummethode.

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P;	+	+	+	+	?
D:	+	+	+	?	?
B:	?	?	—	—	—

Sectie: ovarium in volle productie; 1 klein droog abnormaal follikeltje. *S. enteritidis* var. *essen* werd geïsoleerd uit nier, ovarium en uit het abnormale follikeltje.

(Deze eend werd destijds van een bedrijf opgevraagd op grond van zijn zeer geringe, dubieuze serumreactie; de bloeddruppelreactie, zie proef 5, was toen negatief.)

Uit een tijdens het leven gelegd ei werd bacil gekweekt.

Woerd 6615. Bloeddruppelaggl.: alles — .

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+	?	?	—	—
D:	?	?	?	—	—
B:	—	—	—	—	—

Sectie: geen afwijking. *S. enteritidis* var. *essen* werd niet gekweekt.

Eend 1650. Bloeddruppelaggl.: P ; +++ ; D : + ; B : ? .

Snelserummethode:

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
P:	+	++	++	++	+
D:	+++	+++	+++	+++	++
B:	?	?	?	—	—

Sectie: peritonitis-oöphoritis. *S. enteritidis* var. *essen* werd gekweekt uit alle abnormale follikels en uit het ovarium.

Uit het bovenstaande volgt (zie de eenden 136 en 111) dat ook reeds zeer gering reageerende dieren als besmet dienen te worden beschouwd. Voorts zij verwezen naar (38) waarin vele secties en agglutinaties, volgens de buisjes —, snelserum — en bloeddruppelmethode, vermeld zijn.

Proeven bij zoogdieren (konijnen en zilvervossen).

Uit de reeds genoemde proeven is komen vast te staan, dat met *S. pullorium*-antigeen de *S. enteritidis* var. *essen*-infectie bij de eend is op te sporen, hetwelk berust op het feit, dat beide bacillen hetzelfde O-antigeen bezitten. Dit moet nu ook van belang zijn bij alle *Salmonella*-infecties, waarbij dit O-antigeen voorkomt. Een dergelijke infectie is in ons land bekend bij den zilvervos. Alle tot nu toe in ons land geïsoleerde stammen uit zilvervossen bleken volgens uitvoerig verrichte agglutinaties en biochemisch onderzoek *S. enteritidis* var. *dublin* te zijn (antigeenstructuur IX, XIII : g, p.) (5, 6). De diagnose moest dus zeer waarschijnlijk te stellen zijn met *S. pullorum* antigeen (IX, XIII).

9. Het eerste experiment hierover werd verricht met een buisje bloed, ingezonden door Prof. Klarenbeek, die een onderzoek naar *Salmonella* op grond van de symptomen van een zieken zilvervos in zijn kliniek van belang achtte. De snelserum-agglutinatie verliep snel en sterk positief. Prof. Klarenbeek was zoo bereidwillig hierna de bloeddruppelmethode zoowel bij den zieken vos als bij den gezonden vos te laten toepassen. De reactie bij den gezonden vos verliep negatief, bij den zieken sterk posi-

tief. Hierna werd besloten bij ingekomen gestorven vossen steeds het bloed te onderzoeken met *S. pullorum*-antigeen. Er werden 3 bloedmonsters, 3 levende vossen en 27 cadavers onderzocht. Bij 1 bloedmonster en bij 1 levenden vos en bij 7 cadavers was de reactie positief; na voortgezet onderzoek bleek steeds *S. enteritidis* var. *dublin* infectie in het spel te zijn. In de andere gevallen was de reactie negatief, hier kon ook nimmer *S. enteritidis* var. *dublin* infectie aangetoond worden.

Bij twee levende gezonde vossen kon aangetoond worden, dat alleen *S. pullorum*-formol-antigeen geen storende roode bloedlichaampjesagglutinatatie geeft, de andere formolantigenen wel.

10. Bij konijnen kon ook een onderzoek ingesteld worden, dank zij de medewerking van Dr. C. A. van Dorssen, die zijn door hem voor serumbereiding behandelde proefkonijnen hiervoor beschikbaar stelde. Het onderzoek werd verricht met *S. pullorum*-formol-antigeen, *S. enteritidis* var. *essen* (eend IV)-formolantigeen, *S. typhi-murium* formolantigeen. Het resultaat was:

	<i>S. pull.</i> form. antigeen	<i>S. ent. var</i> <i>essen</i> form. ant.	<i>S. typhi-</i> <i>mur.</i> form. ant.	Opmerkingen
Konijn 772 (normaal)	—	r —	—	
Konijn norm. (voorraad)	—	—	—	
Konijn 777 (voorbehandeld met <i>S. typhi</i> IX : d).	++	r +	—	snelle reactie.
Konijn 778 (voorbeh. met <i>S. ent. var. essen</i> , (IX, XIII: g, o, m.)	+++	r +++	—	snelle reactie.
Konijn 773 (voorbeh. m. <i>S. ent. var. moscow</i> IX, XIII: g, o, q)	+++	r +++	—	snelle reactie.
Konijn 774 (voorbeh. m. <i>S. enteritidis</i> IX, XIII: g, o, m.)	+++	+++	—	snelle reactie.
Konijn 739 (voorbeh. m. <i>S. typhi-murium</i> IV, V, XIII: i : 1, 2, 3.)	+	++	+++	De le 2 reacties gering, de 3e sterk en snel.
Konijn 776 (voorbeh. m. <i>S. oranienburg</i> VI, VII : m, f.)	?	?	?	langzame geringe actie.

Bij deze proef werd nu en dan een meestal geringe agglutinatatie van de roode bloedlichaampjes waargenomen bij het *S. enteritidis* var. *essen* (eend IV)-formol-antigeen. (Bij het *S. typhi-murium*-formolantigeen werd deze agglutinatatie meestal in veel mindere mate of niet gezien.) Afgezien van de geringe agglutinaties bij konijn 776, waar hier niet verder op in zal worden gegaan, beantwoordt de uitslag aan de verwachtingen, immers steeds werd het O-antigeen IX, XIII snel en duidelijk aangewezen en bij konijn 739 factor XIII.

Conclusie:

Uit het voorgaande is gebleken, dat het *S. pullorum*-formol-antigeen zeer geschikt is om agglutinaties te verrichten zoowel bij vogels als zoogdieren voor het opsporen van al die *Salmonella*-infecties, waarbij het O-antigeen IX, XIII voorkomt. De reactie is uit te voeren volgens de snelserummethode en bij niet te lage agglutinatietiter ook volgens de bloeddruppelmethode. Behalve bij levende dieren is de reactie ook te verrichten bij doode dieren. In het laatste geval moet men evenwel rekening houden met het feit, dat de agglutinenen postmortaal ten gronde kunnen gaan, zoodat hier een negatieve reactie geen diagnostische waarde heeft.

De voordeelen van het gebruik van *S. pullorum*-antigeen zijn:

- a. gemakkelijke, voor den mensch ongevaarlijke, bereiding;
- b. duidelijke agglutinatatie-uitvlokking;
- c. geen storing door roode bloedlichaampjes.

De agglutinatatie met *S. pullorum*-antigeen dient toegepast te worden behalve bij de bestrijding bij *morbus pullorum* van de kip ook bij de *S. enteritidis* var. *essen*-infectie van de eenden en de *S. enteritidis* var. *dublin*-infectie van den vos; bij de eend is een geringe positieve reactie reeds een indicatie voor geïnfec-teerd zijn.

Eindconclusie.

Uit alles wat hieraan voorafging, moge gebleken zijn dat de *Salmonellose* bij de eend en dus ook de voedselvergiftiging bij den mensch veroorzaakt door de eend, te bestrijden is.

Voor den mensch geldt, in elk geval voor zoolang ons land geen *Salmonella* vrije eendenbedrijven bezit, dat het eten van rauwe of onvoldoende gekookte eendeneieren in welken vorm

ook, en het eten van onvoldoend gekookte eend, gevaar kan opleveren.

Men zal dus alleen al om deze redenen de eendenfarms *Salmonella* vrij moeten maken; doch bovendien is dit tevens een economische noodzaak daar *Salmonellose* op een eendenfarm een ernstige bedreiging van het bedrijf is.

De bestrijding op de eendenfarm dient gebaseerd te zijn op deze twee hoofdpunten:

a. nauwgezette hygiëne, b. minstens 1 \times per jaar bloed-serumonderzoek van alle eenden, die op het bedrijf aanwezig zijn. Dat negatief reageerende dieren toch positief zouden kunnen zijn, is een mogelijkheid die ik in 1935 (38) reeds noemde, dit komt echter niet in die mate voor dat de agglutinatie in de praktijk onbruikbaar zou zijn, integendeel de doelmatigheid is gebleken uit het volgende. In een gebied van ± 20.000 eenden bleek vrij veel kuikensterfte te zijn, sectie en bacteriologisch onderzoek der kuikens en agglutinaties bij de volwassen eend bracht *S. typhi-murium*- en *S. enteritidis* var. *essen* aan het licht. Alle 20.000 dieren werden volgens de snelserummethode onderzocht, grootendeels door collega *van Haselen*, met als resultaat dat ongeveer ruim een derde van het totaal besmet was. Besloten was streng een scheiding te maken tusschen positieve en negatieve dieren, zoodat ook zeer geringe dubieuze reacties als positief werden aangemerkt. Alleen van de negatieve dieren mocht gebroed worden, terwijl alle positieve en dubieuze dieren geïsoleerd werden. (Het groot aantal dieren vernietigen, wat theoretisch het beste zou zijn, bleek voor de farmhouders economisch niet doorvoerbaar te zijn.) Dit jaar was de kuikensterfte miniem. Het verschil met het vorige jaar was frappant. Een steekproef toonde aan dat van de besmette dieren nog steeds bijna 100 % positief reageerde, doch dat van de verleden jaar negatieve dieren een deel positief was geworden. Door voortgezette jaarlijksche agglutinatie en bodemdesinfectie zal een farm *Salmonella* vrij gemaakt moeten worden. Voorts dient het broeden, de opfok enz. steeds op hygiënische wijze te geschieden. Door zoo te handelen, lijdt het m.i. dan ook geen twijfel of de *Salmonellose* op onze eendenfarms zal afnemen. Dit beteekent dan: minder gevaar voor voedselvergiftiging voor den mensch, geen groote schade meer op het bedrijf, terwijl landen die nu eieren van ons importeerden niet meer *Salmonellose* kunnen noemen om onze export te belemmeren.

LITERATUUR.

1. *Bahr, L. and Cristensen, N. P. C.* Investigations concerning the b. pullorum and bacteria pertaining to the salmonella group.
The veterinary journal 89, 483, (1933).
2. *Bahr, L. and Cristensen, N. P. C.* Einige serologische Untersuchungen betreffende des B. pullorum und einiger der Salmonella Gruppe zugehörenden Bakteriën.
(Meddelelser Fra Statens Veterinaere serumlaboratorium 139).
3. *Beller, K. und Reinhard, H.* Ueber das Vorkommen von Bakterien der Paratyphusgruppe in Enteneiern.
Berl. Tierärztl. Wochenschr. 50, 226, (1934).
4. *Bernard, H.* Ein neuer Bakterientyp aus der Paratyphus-Enteritisgruppe als Erreger des Verkälbens in einem Rinderbestande.
Z. Hyg. 117, 352, (1935).
5. *Blieck, L. de, en Jansen, Jac.* Paratyphus bij zilvervossen.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde. 62, 457, (1935).
6. *Blieck, L. de, en Jansen, Jac.* De bestrijding der zilvervossen-salmonellose.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde. 62, 1247, (1935).
7. *Boecker, E.* Ueber die bei dem laufenden Material des Untersuchungsamtes des Instituts „Robert Koch“ beobachteten Typen der Paratyphus-Enteritis Gruppe.
Zentrbl. f. Bakt. I Orig. 133, 358, (1935).
8. *Borcila, J.* Schaffung von Enteritisbakterienausscheidern bei Kaninchen und Hühnern.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 42, 802, (1934).
9. *Brill, J.* Vergleichende Analyse der Receptoren von Bact. abortus equi Stämmen.
Jahresber. Vet. Med. 56, 253 (1935).
(Wiadom Weteryn. 13, 1, (1934))
10. *Bruns, H. und Fromme, W.* Ueber Nahrungsmittelerkrankungen durch Enteneiern.
Münch. Med. Wochenschr. 81, 1350, (1934). (zie ook blad. 1372.)
11. *Clarenburg, A. en Dornickx, Ch. G. J.* Voedselvergiftiging bij den mensch in verband met duivenparatyphose.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde. 59, 545, 621, 670 (1932).
12. *Clarenburg, A. en Pot, A. W.* Voedselvergiftiging bij den mensch in verband met eendenparatyphose.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 62, 1240, (1935).
13. *Dorssen, C. A. van.* De nieuwe nomenclatuur van de Typhus-Paratyphus-groep.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 62, 570, (1935).
14. *Dorssen, C. A. van.* Salmonella typhi-murium-infectie bij een kleine zee-meeuw, Larus canus.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 62, 1263, (1935).

15. *Dorssen, C. A. van.* Over de waarde van preventieve vaccinatie bij dier-salmonellosen. Tevens bijdrage tot de kennis van enkele dezer ziekten. Proefschrift Utrecht 1936.
16. *Doyle, F. M.* Baertrijcke infections of chicks.
J. comp. path. and therap. **40**, 71, (1927).
- 16a. *Edwards, Ph. R.* Fermentative varieties of *Salmonella aertrycke*. J. Inf. Dis. **58**, 225, 1936.
17. *Ehrlich.* Wild und Hund. **33**, 874, (1927).
18. *Elkeles, G. und Standfuss, R.* Die Paratyphosen Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Kolle-Wassermann, Dritte erweiterte Auflage, Dritter Band, Zweiter Teil, bladz. 1585.
19. *Emmel and Stafseth.* *Salmonella aertrycke* infections in the canary bird. J. Am. Vet. med. Ass. **75**, 230, (1929).
20. *Fromme, W.* Zur Ursache von Nahrungsmittelvergiftungen durch Enteneier.
Dtsch. med. Wochenschr. **59**, 655, (1933).
21. *Fromme, W.* Nahrungsmittelvergiftungen nach Genuss von Rührei aus Enterieiern.
Dtsch. med. Wochenschr. **60**, 1969, (1934).
22. *Fromme, W.* Weitere Beobachtungen über Nahrungsmittelvergiftungen durch Enteneier.
Arch. f. Hyg. **113**, 29, (1934).
23. *Furth, E. und Klein, K.* Neue Feststellungen über die Entstehungsursache von Enteritis-Gruppenerkrankungen (Enteritis und Entenei).
Veroff. Med. verw. **39**, 363, (1933).
24. *Gaiger, S. H. and Davies, G. O.* „Keel disease“ in ducklings in Britain. J. comp. path. and ther. **43**, 125, (1930).
25. *Gardner, A. D.* The small-flaking or „O“ agglutination of permanent standardised „O“ suspensions of *B. typhosus* by the serums of normal; inoculated and infected persons.
The Jl. of Hygiene **28**, 376, (1928/9).
26. *Haffke, H.* Enteritisbakterien bei gesunden und bei künstlich infizierten Enten.
Diss. Hannover 1934.
27. *Hemshorn, A.* Bakteriologische, serologische und pathologisch-anatomische Untersuchungen im Zusammenhang mit natürlichen und künstlichen Enteritisinfektionen bei Enten.
Vet. med. Diss. Berlin 1935.
28. *Herrmann, W.* Ueber Varianten in der Paratyphusgruppe: Gasloser Paratyphus B und rhamnosenegativer Erreger vom Breslautypus.
Zentr. bl. f. Bakter. I. Orig. **113**, 108, (1929).
29. *Herrmann, W.* Ein gasloser-Breslaustamm aus Fäzes und ein Pullorustamm aus Kartoffelsalat. Zentralbl. f. Bakt. I Orig. **132**, 148, (1934).
30. *Hohn, J. und Herrmann, W.* Die Typen der Gärtnerbakterien und die Quelle ihrer Infektion in der Tierwelt.
Zentrbl. f. Bakt. I Orig. **134**, 183, (1935).

31. *Hohn. J. und Herrmann. W.* Ergänzungen zu der Arbeit im Zbl. f. Bakter. I Orig. Band 133.
Die Typen der Gärtnerbakterien und die Quelle ihrer Infektion in der Tierwelt.
Zentr.bl. f. Bakt. I Orig. 134, 277, (1935).
32. *Hohn. J. und Herrmann. W.* Der Kulturtyp der Erreger der Typhus-Paratyphus-Gruppe und seine Bedeutung für die Standortsgenundenheit.
Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankh. 117, 722, (1936).
33. *Hole. N.* Salmonella infections in ducklings.
J. comp. path. and ther. 45, 161, (1932).
34. *Jansen. Jac.* Verslag van den 5den klinischen avond op 27 Januari 1934.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 61, 488, (1934).
35. *Jansen. Jac.* Tuberculose en partyphus bij eenden en eenige andere eendenziekten.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 61, 1025, (1934).
36. *Jansen. Jac.* Paratyphus bij eenden (Eendensterfte, voedselvergiftiging bij den mensch, bestrijding).
Tijdschrift voor Diergeneeskunde 61, 1247, (1934).
37. *Jansen. Jac.* Paratyphus bij eenden. (Voortgezette determinatie van 7 Gärtnerstammen).
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 61, 1309, (1935).
38. *Jansen. Jac.* Agglutinatiemethoden bij eendensalmonellose.
Tijdschrift voor Diergeneeskunde 62, 517, (1935).
39. *Jansen. Jac.* Snelagglutinaties met Salmonella-antigenen bij onderzoek op Salmonella infectie (bij kippen, eenden, konijnen en zilvervossen).
Tijdschrift voor Diergeneeskunde. 62, 1253, (1935).
40. *Jansen. Jac.* Ueber die Salmonella enteritidis aus der Hausente.
Zentrbl. Bakt. I Orig. 135. 414. (1935).
41. *Jansen. Jac.* Eendenkuikensterfte door S. typhimurium en S. enteritidis var. essen.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 63, 140, (1936).
42. *Jansen. Jac.* Factor XIII van S. enteritidis var. essen en zijn invloed op de snelagglutinaties in de praktijk der eendensalmonellabestrijding.
Tijdschr. voor Diergeneeskunde 63, 599, (1936).
43. *Jansen. Jac.* Agglutination mit Dottersubstanz bei Entensalmonellose.
Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 44, 340, (1936).
44. *Kauffmann. F.* Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Kolle-Wassermann, Dritter Band, zweiter Teil, 1931, bladz. 1614.
45. *Kauffmann. F. und Silberstein. W.* Untersuchungen über einige neue Salmonella-Typen.
Zentrbl. f. Bakt. I. Org. 132, 431, (1934).
46. *Kauffmann. F.* Ueber einen neuen serologischen Formenwechsel der Typhusbacillen.
Zeitschr. Hyg. und Inf. Krankh. 116, 617, (1935).
47. *Mac. Farland.* The nephelometer.
Jl. of Am. Med. Ass. 49, 1176, (1907).
48. *Manninger. R.* Allotrovosi Lapok, nr. 21 (1918), referaat in de Berl. Tierärztl. Wschr. 35, 5, (1919).

49. *Manninger. R.* Allotrovosi Lapok, nr. 25 (1918), referaat in de Berl. Tierärztl. Wschr. 35, 98, (1919).
50. *Meyer.* Die Bedeutung des Geflügels für die Entstehung von Lebensmittelvergiftungen.
Z. fleisch- und Milchhyg. 44, 81, (1933).
51. *Miesznier. H. und Köser. A.* Entenei und Lebensmittelvergiftungen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 42, 717, (1934).
52. *Müller. O. und Rodenkirchen. J.* Ueber Lebensmittelinfektionen durch *Bacillus ent.* Gärtner in Muhlheim-Ruhr 1930—1932.
Veroff. Med. verw. 39, 377, (1933).
53. *Müller. R.* Hühnerenteritis und atypische Gärtnerbakterien bei Gastroenteritiden durch Eierspeisen.
Münch. med. Wschr. 80, 1771, (1933).
54. *Paille. R.* Typhose aviaire et pouvoir agglutinant des oeufs.
Revue vet. et Jl. med. vet. 87, 578, (1935).
55. *Pallaske, G.* Paratyphus inf. (Gärtner) bei Erpeln.
Arch. Tierheilk. 62, 89, (1930/1931).
56. *Pallaske. G.* Zur Frage von Nahrungsmittel vergiftungen durch Enteneier.
Dtsch. med. Wschr. 59, 1010, (1933).
57. *Rettger. Leo.* Endemic paratyphoid infection in turkeys.
J. amer. vet. med. assoc. 82, 452, (1933).
58. *Rettger, J. F. and Scoville. M. M.* Bacterium anatum, n.s., the etiologic factor in a widespread disease of young ducklings known in some places as „Keel”.
Journal of Inf. Diseases 26, 217, (1920).
59. *Sauer.* Ueber Nahrungsmittelerkrankungen durch Enteneier.
Münchener Med. Wochenschr. 81, 1548, (1934).
60. *Schaaf. J.* Zur infektiösen Enteritis der Enten. *Zbl. Bakter. I. Orig.* 128, 519, (1933).
61. *Schaaf. J.* Die infektiöse Enteritis der Enten und ihre Bedeutung für die Nahrungsmittelhygiene.
Tierärztliche Rundschau 40, 455, (1934).
62. *Schaaf. J.* Untersuchungen über den Ansteckungskreislauf bei der infektiösen Enteritis der Enten.
Arch. für Wissensch. und prakt. Tierheilk. 67, 224, (1934).
63. *Schönberg. F.* Ueber die Infektion von Enteneiern mit Breslau-Bakterien vom Eileiter aus. Gleichzeitig ein Beitrag zur Verhütung der durch Enteneier verursachten Lebensmittelvergiftungen.
Berl. Tierärztl. Wschr. 51, 474, (1935).
64. *Scott. W.M.* Food poisoning due to eggs.
Brit. med. J. 56, (1930).
65. *Scott. W. M.* Consequences of Salmonella infections of eggs.
J. of Path. 35, 655 (1932).
66. *Scott. W. M.* Les empoisonnements par les oeufs de cane contenant des bacilles pathogènes.
Office Internat. d'Hyg. publ. 25, 828, (1933).
67. *Seligmann. E.* Eine Massenvergiftung durch Enteneier.
Schweiz. Med. Wochenschrift. 65, 550, (1935).

68. *Spiegl. A. und Lerche. M.* Beitrag zur Pathologie des Hühnerparatyphus. Pfeilers Hühnertyphus).
Dtsch. Tierärztl. Woch.schr. 32, 236, (1924).
 69. *Smith. J.* Sporadic Salmonella infections: A new salmonella type.
Journ. of Hyg. 34, 351, (1934).
 70. *Standfuss. R.* Systematik der Tierparatyphosen.
Paratyphus erkrankungen der Haustiere.
Twelfth international veterinary congress. New York.
N. Y. U.S.A., August 13—18, 1934.
 71. *Strozzi. P.*
La Clin. Vet. 54, 927, (1931).
 72. *The Genus Salmonella Lignières*, 1900. Issued by the Salmonella sub-committee of the nomenclature committee of the international society for microbiology.
Journ. of Hyg. 34, 333, (1934).
 73. *Warrack. G. H. and Dalling. T.* Salmonella infections in young ducklings and ducks' eggs.
Vet. J. 89, 483, (1933).
 74. *Wesselmann. A.* Bakteriologische Untersuchungen von Enteneiern, von mit Enteneiern hergestellten Lebensmitteln und von Bakterien-stämme im Zusammenhang mit bakteriellen Lebensmittelvergiftungen beim Menschen.
Vet. med. Diss, Berlin 1935.
 75. *Willfuhr, Fromme und Bruns.* Nahrungsmittelerkrankungen durch Enteneier.
Veröff. Med. verw. 39, 337, (1933).
-

Salmonellose der eend als oorzaak van voedselvergiftiging (consumptie-ijs) bij den mensch

DOOR

K. de KONING.

Dierenarts bij den Keuringsdienst voor Waren te Utrecht.

In de maand Juli 1936 ontving de Directeur van den Keuringsdienst voor Waren voor het gebied Utrecht een verzoek van den burgemeester der gemeente O., hulp te verleen en bij het opsporen van de oorzaak van een consumptie-ijs vergiftiging. Op de kermis te W. zouden een viertal venters consumptie-ijs verkocht hebben, waarna vele menschen, ongeveer 60, ziek waren geworden. Volgens de verklaringen der zieken zou het ijs, verkocht door een zekere van O. te O., de oorzaak zijn, daar alle patiënten van diens ijs hadden gegeten, terwijl de menschen die van de drie anderen ijs hadden gekocht niet ziek waren geworden. Daar de gemeente O. is gelegen in het gebied van den Keuringsdienst voor Waren voor het district Utrecht werd in opdracht van den Directeur door mij ten spoedigste een onderzoek ingesteld. Het resultaat van dit onderzoek was aanvankelijk van dien aard, dat geen aanwijzing was te vinden voor de oorzaak. De bereidplaats van het ijs van v. O. voldeed aan alle eischen bij het consumptie-ijsbesluit gesteld en verkeerde, evenals het vaatwerk, in een zindelijken toestand. Consumptie-ijs was niet meer in voorraad waardoor geen monster kon worden genomen. Het bedrijfswater (Norton) werd bacteriologisch en chemisch onderzocht, het vertoonde evenwel geen afwijkingen. Verder deelde v. O. mede, dat dezelfde grondstoffen als steeds waren gebruikt voor het ijs en dat de bereiding op dezelfde manier als vroeger was geschied. Hiermede zou het onderzoek zijn geëindigd, indien ik ongeveer een week later niet door toevallige omstandigheden een onderhoud mocht hebben met den

gemeente-arts der gemeente W., waarbij deze mij mededeelde dat de oorzaak der ziekte der patiënten was een *paratyphus* bacil van het *Aertrijcke* type. De bacil was geïsoleerd uit de faeces der patiënten door het „Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid”.

Uit een reeks publicaties van *Jansen* (zie Tijdschr. voor Diergeneeskunde 1934, 1935 en 1936) en een artikel van *Clarenburg* (Tijdschr. voor Diergeneeskunde 1935) was het mij bekend, dat bij eenden Salmonellose (= paratyphus) voorkomt, waardoor eieren besmet kunnen zijn en daarom de oorzaak van voedselvergiftiging kunnen wezen. Om zekerheid te hebben of v. O. ook eenden- of duiveneieren (Salmonellose komt namelijk ook bij duiven voor) had gebruikt bij de bereiding van het consumptie-ijs, besloot ik het onderzoek in die richting voort te zetten. Het resultaat was, dat v. O. verklaarde steeds kippen-eieren te gebruiken, doch dat het wel eens was voorgekomen, dat hij eendeneieren had gebruikt, wanneer hij geen kippen-eieren meer voorradig had. Bij verdere informatie deelden de vrouw van v. O. en haar zuster mede, dat voor het ijs, dat was verkocht op de kermis te W. alleen eendeneieren waren gebruikt; v. O. wist zich dat nu ook te herinneren, en deelde mij mede, dat hij het consumptie-ijs zelf had bereid en wel op de volgende wijze. Eerst maakte hij de compositie en bracht die aan de kook, koelde ze af en voegde daarna eenige geklutste eendeneieren toe. Vervolgens werd de massa gedraaid tot consumptie-ijs. v. O. betrok de eendeneieren steeds van denzelfden veehouder, die ook te O. woont. De meeste eendeneieren werden gebruikt voor de beschuitfabricage, v. O. is namelijk brood- en banketbakker. Bovendien verklaarde v. O. bij dit bezoek, dat hij zelf en ook zijn zoon van het bewuste ijs hadden gegeten en beide spoedig daarop ziek waren geworden (diarrhee, koorts en braken), zoodat zij medische hulp moesten inroepen. Het gelukte mij een zestal dezer eendeneieren voor onderzoek mede te nemen. Op steriele wijze werd bouillon volgens *Müller*, gent met dooier van elk der eieren, na 6 uur bebroeden werd uit deze bouillon overgeënt op Gassnerplaten, na 1 dag bebroeden was op een der platen een cultuur van uitsluitend gele kolonies gegroeid. Een suspensie van de gegroeide cultuur gaf een positieve agglutinatie met *S. typhi-murium*- (= *Aertrijcke*) serum. Tijdens het enten uit de dooiers werd van elk ei met een weinig

dooier een agglutinatie verricht met *S. typhi-murium* antigeen (zie Jansen: Agglutination mit Dottersubstanz bei Entensalmonellose. Deutsche Tierärztl. Wschr. 44, 340, (1936)). Bij twee van de zes dooieragglutinaties werd een geringe positieve agglutinatie waargenomen. Uit een van deze twee eieren werd de bacil gekweekt.

Om van de uitbreiding der besmetting onder de 25 eenden van den veehouder op de hoogte te komen, heb ik van 24 eenden bloed kunnen afnemen. Na hiervan bloedserum te hebben verkregen, is gebleken dat volgens de snelmethode 22 maal een duidelijk positieve agglutinatie optrad met *S. typhi-murium*-antigeen, eenmaal was de reactie twijfelachtig en eenmaal negatief.

Gezien de feiten, dat alle zieken hadden gegeten van het consumptie-ijs van v. O., dat de eendeneieren rauw bij de afgekoelde compositie waren gevoegd, dat v. O. en zijn zoon ook van het zelfde ijs hadden gegeten en ziek waren geworden met verschijnselen van acute gastro-enteritis, dat eendeneieren werden betrokken van een veehouder, wiens eenden nagenoeg allen met *S. typhi-murium* besmet bleken te zijn, staat het vrijwel vast, dat deze vergiftiging is terug te voeren op het gebruik van consumptie-ijs besmet met *S. typhi-murium*, afkomstig van de eend. De gekweekte cultuur en de besmette eenden werden afgestaan aan het Instituut voor Parasitaire- en Infectieziekten der Rijks-Universiteit te Utrecht.

Salmonellose der eend als oorzaak van voedsel- vergiftiging (consumptie-ijs) bij den mensch

DOOR

Dr. JAC. JANSEN.

In het hieraan voorafgaande gelijknamige artikel werd een belangrijk geval van voedselvergiftiging vermeld, waarvan de oorzaak consumptie-ijs bleek te zijn. Het Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid toonde in faeces van patiënten, die dit ijs gegeten hadden, „*paratyphus Aertrijcke*” aan. De zeer vermoedelijke eigenlijke oorzaak van deze voedselvergiftiging nl. de eend, werd opgespoord door den Keuringsdienst voor Waren voor het gebied Utrecht, nl. door den daaraan verbonden zijnden dierenarts *de Koning*. *Wederom is dus gebleken, van hoeveel belang het is, dat aan dergelijke keuringsdiensten deskundigen op veterinair gebied verbonden zijn.* De door *de Koning* opgespoorde met *S. typhi-murium*-antigeen positief reagerende eenden en de door hem uit een ei van deze eenden gekweekte bacteriecultuur, die een positieve agglutinatie gaf met *S. typhi-murium*serum, werden mij voor verder onderzoek afgestaan, waarvoor ik hem ten zeerste dank zeg.

Onderzoek der uit het eendenei gekweekte bacil.

De bacil bleek na morphologisch en cultureel-biochemisch onderzoek een *Salmonella* te zijn. Daar deze stam een positieve agglutinatie had gegeven met bekend *S. typhi-murium*-serum, lag het dus zeer voor de hand, dat het een *S. typhi-murium* zou zijn, immers in ons land werd tot nu toe alleen *S. enteritidis* var. *essen* en *S. typhi-murium* (verouderde naam *Paratyphus-Aertrijcke*) bij de eend aangetoond. Het is gebleken, dat *S. typhi-murium*stammen niet steeds volledig onderling gelijk zijn. De

naam *S. typhi-murium* vat een aantal *Salmonella's* samen, die bij elkaar behooren op grond van hun antigeenstructuur. Een *S. typhi-murium* met een volledig aantal antigeen- (agglutino-geen) componenten heeft als formule IV, V, XIII : i : 1, 2, 3. De lichaamscomponent (O-antigeen) V kan echter ontbreken. Bij de vier reeds vroeger door mij vermelde culturen uit eenden hadden drie stammen de factor V wel, één stam miste echter de V. De nu onderzochte cultuur werd met specifiek IV- en met factor V-serum onderzocht. Het onderzoek geschiedde als snel-agglutinatie op een voorwerpglas. Het serum was verdund 1 : 20. Zoowel met IV- als met V-serum was de agglutinatie duidelijk positief.

Ook kon factor XIII aangetoond worden. Het was dus een stam met de O (= lichaams)factoren IV, V en XIII. *S. typhi-murium* wordt getypeerd door het bezitten der specifieke H (geesel) factor i; deze i factor werd aangetoond in het serum van een der eenden. Het serum werd nl. verzadigd met *S. paratyphi-B* hierdoor werden alle eventueel aanwezige *S. typhi-murium* agglutinenen van het eendenserum gebonden, behalve de aan te toonen i (en 3). De 3 werd gebonden door te verzadigen met *S. cholerae-suis* var. *kunzendorf*, zoodat dan alleen de i-agglutinenen konden overblijven. Met dit serum werd inderdaad geen agglutinatie meer verkregen met *S. paratyphi-B* en ook niet met *S. cholerae-suis* var. *kunzendorf*, (wat de volledige verzadiging bewees), echter wel met een bekende *S. typhi-murium* stam en ook met de stam gekweekt uit een ei, nl. tot in een verdunning 1 : 40. De agglutinatie was zuiver grofvlokkig. H (= geesel) agglutinenen geven nl. grofvlokkige agglutinatie. Wij hebben dus inderdaad te maken met een *S. typhi-murium*.

De eendenei-stam werd voorts onderzocht volgens de methode van *Hohn en Hermann* (Der Kulturtyp der Erreger der Typhus-Paratyphus-Gruppe und seine Bedeutung für die Standortsgebundenheit. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Kr. 117, 722, (1936)) op zijn vergistingsvermogen. Hierbij bleek het rhamnose-negatieve karakter, wat dus overeenkomt met de reeds eerder door mij vermelde stammen van de eend. Dit is een belangrijk punt daar vele *S. typhi murium* stammen van andere diersoorten rhamnose positief zijn. *Edwards* (Fermentative varieties of *Salmonella* aertrijcke. J. Inf. Dis. 58, 225, (1936)) in Amerika vermeldt eendenstammen die rhamnose (Bitter) vergisten. De tot

nu toe door mij onderzochte Nederlandsche eenden-*S. typhi-murium* stammen (zoowel *die met als zonder V*) waren allen rhamnose negatief, welke bevinding overeenkomt met die van *Hohn en Herrmann* in Duitschland. Evenals dus het vinden van een dulcitol negatieve *Salmonella* (IX, XIII : g, o, m.), dit is de *S. enteritidis* var. *essen*, de verdenking op de eend doet vallen, doet het rhamnose negatief zijn van een *S. typhi-murium* in ons land de eend als oorzaak van voedselvergiftiging vermoeden. Men bedenke echter, dat rhamnose-negatieve *S. typhi-murium* stammen behalve bij de eend soms ook bij andere dieren (o.a. rat en meeuw) kunnen voorkomen.

Het speet ons, dat wij den uit het eendenei gekweekten stam niet hebben kunnen vergelijken met den door het „Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid” uit de faeces der patienten geïsoleerden stam, daar deze, toen wij daarom vroegen, niet meer was aangehouden.

Onderzoek der eenden.

Bij alle eenden werd nogmaals het bloedserum onderzocht op agglutinenen, de resultaten kwamen overeen met die, vermeld door *de Koning*; hierna werden de dieren gedood. Velen bleken de voor Salmonellose typische oöphoritis te hebben nl. verharde follicels. Bij één eend werd een bacteriologisch onderzoek ingesteld, uit het ovarium werd een *Salmonella* gekweekt die geheel overeenkwam met die uit het ei.

Coli-toxine

DOOR

Dr. A. PONDMAN en Mej. A. W. de LIND v. WIJNGAARDEN.

In verband met mededeelingen der laatste jaren, waarbij aan coli-serum bij aandoeningen van verschillenden aard een belangrijke therapeutische waarde wordt toegekend, is langzamerhand de belangstelling voor dit serum sterk toegenomen.

Reeds in 1920 werd door *Hamburger*¹⁾, gevolgd in 1922 door *Langer*¹⁾ en *Mengert*¹⁾, de aandacht gevestigd op het feit, dat bij de toxikosen der zuigelingen met coliserum gunstige resultaten waren te bereiken. Maar vooral de mededeeling van *Vincent*²⁾ in 1925, waarin hij inzonderheid wijst op de verschillende giftige producten der colibacillen, gaf een nieuwe richting aan, waarmede met de coliserumbereiding rekening zou moeten worden gehouden. In tal van mededeelingen^{3) 4)} werd door hem voor de groote waarde van het coliserum, ook bij afwijkingen op neurologisch gebied^{5) 6)} gestreden. Vincent bleef in zijn meening over het coliserum niet alleen staan, in 1927 wees ook *Katzenstein*⁷⁾ op de therapeutische waarde van het coliserum bij gevallen van coli-peritonitis. Bij deze aandoeningen nam hij afwijkingen in het vaso-motorisch centrum waar (koude extremiteiten, ontbreken van den pols bij behouden bewustzijn, innervatiestoornissen van den darm), waarbij volgens hem toxine zeker een rol speelt. In het volgende jaar vonden zijn waarnemingen steun in de, bij dergelijke gevallen met coliserum bereikte resultaten door *Knopp*⁸⁾ en *Kohler*⁹⁾. Ook zij komen tot het oordeel, dat het voortzetten van deze behandeling alleszins gerechtvaardigd is. *Künz* maakt hierbij de opmerking, dat de nadruk gelegd moet worden op de anti-toxische waarde van het coliserum, waarop ook *Vincent* en *Katzenstein* hadden gewezen

Vincent ²⁾ neemt aan, dat de colibacil drie verschillende toxines vormt, n.l. I. de *exotoxine soluble*, die neurotrope eigenschappen zou bezitten, II. de *endotoxine soluble* met enterotrope eigenschappen en ten slotte III. de *endotoxine insoluble*. Over de aantooning dezer toxines volgen bij het eigen onderzoek nadere beschouwingen. Weinberg ¹⁰⁾ en Prévot kunnen de waarneming van Vincent bevestigen. Toch meenen zij, dat de gifstoffen, die ten slotte de proefdieren doodden, hoofdzakelijk eerst in het dierenlichaam gevormd worden. Plantinga ¹¹⁾, die aanneemt, dat de peracutedarmaandoening bij zuigelingen door een gift, n.l. colitoxine wordt veroorzaakt, meent, dat hier twee stoffen moeten worden aangenomen n.l. een endotoxine en een aggressine.

G. en A. Magheru en H. Creanga ¹²⁾ hebben deze verschillende toxines van Vincent nader bestudeerd. Zij hebben nagegaan in hoeverre er verband bestond tusschen de *virulentie* van de colibacillen en de *verschillende* door deze bacillen geleverde toxines. Evenzoo hebben zij nagegaan of de productie der verschillende toxines bij de bacillen in onderling verband stonden, m.a.w. of de aanwezigheid van één der toxines een maat kon vormen ten opzichte der anderen. Evenals Vincent ¹³⁾ komen zij tot de conclusie, dat er in geen enkel opzicht eenige relatie bestaat. Noch het ras, of de eigenschappen van den stam, noch de toxineproductie staan met elkander in eenig, althans waarneembaar, verband.

Demnitz en Scholz ¹⁾ hebben deze onderzoeken over gifvormende colistammen weder opgevat. Hierbij konden zij de scherpe scheiding tusschen een hitte labiel neurotroop *exotoxine* en een thermostabiel enterotroop *endotoxine* niet vinden. Het door hen bereide enterotrope toxine bleek b.v. bij 70° verzwakt te zijn, waarmede dus de thermostabiliteit niet te handhaven was. Maar vooral vestigen zij de aandacht op het feit, dat de exotoxine in principe dezelfde enterotrope eigenschappen bezit als de endotoxine. Witte muizen gaan n.l. bij intraveneuze inspuiting van kiemvrije filtraten van meerdere dagen bebroede bouillonculturen onder gelijke verschijnselen te gronde als bij de inspuiting met extracten van 48 uur op agar gekweekte en gedroogde bacillen. Bovendien konden zij herhaaldelijk aantoonen, dat de volgens Vincent op verschillende wijzen verkregen coligiften door eenzelfde, op één toxine ingesteld anti-

serum, geneutraliseerd werden. Zij nemen dus het standpunt in, dat de colibacil, evenals b.v. de Shiga-bacil, slechts één toxine produceert. De toxines door Vincent als drievoudig aangegeven, meenen zij te kunnen terugbrengen tot één toxine.

Dit, door hen van de colibacil afgescheide toxine blijkt bij intraveneuze injectie muizen te kunnen doden. Deze ingespoten muizen worden 2—3 uur na de intraveneuze toediening somnolent en gaan meest binnen 12—24 uur onder darmverschijnselen te gronde. Bij sectie vindt men naast een sterke *miltvergrooting* geen typische afwijkingen. Konijnen gaan bij intraveneuze injectie op dezelfde wijze binnen 24—48 uur eveneens dood onder verschijnselen van enteritis. Zij vertoonen bij sectie sterk geïnjecteerde darmvaten. Cavia's gaan bij intraperitoneale injectie op dezelfde wijze dood. Bij sectie vindt men dan een steriel exsudaat in de buikholte en een roode verkleuring der bijnieren. Bij intracutane injectie van de toxine in de huid van cavia's en konijnen vormen zich ontstekingsinfiltraten, die in den loop van 2—3 dagen in necrose overgaan. Voor de inspuiting hunner paarden, ter verkrijging van een goed coliserum wordt door hen hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de toxines van 3 typische colistammen, die uitgezocht zijn uit een groot aantal colistammen en waarbij deze 3 stammen zich als goede toxinevormers hebben leeren kennen. Voor de wijze dezer toxinever verkrijging verwijzen wij, om niet in herhaling te vervallen, naar onze eigen waarnemingen.

Voor ons eigen onderzoek naar de toxines der colibacillen zijn wij uitgegaan van 43 stammen, die grootendeels afkomstig zijn uit materiaal van afwijkingen door colibacillen veroorzaakt. Gedeeltelijk waren deze stammen reeds geruimen tijd als laboratoriumstammen aanwezig, gedeeltelijk waren ze sedert kort geïsoleerd.

Om eenigszins georiënteerd te zijn over de eigenschappen dezer stammen werden hun cultuureigenschappen nagegaan. (t. o. v. melk, lakmoeswei, neutraalroodagar, lactose, maltose, glucose, rhamnose, saccharose, manniet en indol, terwijl eveneens de beweeglijkheid in dit onderzoek werd betrokken. Hierbij bleek weder, hoe sterk deze colistammen onderling van eigenschappen konden verschillen.) Op grond van dit onderzoek konden wij de te gebruiken stammen in 9 verschillende groepen

indeelen. Wij hoopten daarmede wellicht eenige aanwijzing te krijgen welke colisoort nu voor ons doel, n.l. toxinevorming, het beste in aanmerking kwam. Vooruitlopend op het verdere onderzoek kunnen wij mededeelen, dat onze hoop volledig werd teleurgesteld en dat wij, evenals Vincent en de beide Magheru's en Creanga, elk verband in dezen zin moesten uitsluiten.

Van deze stammen werd nu allereerst nagegaan in hoeverre zij in staat waren de, door *Vincent* aangegeven, toxines te vormen. Hierbij volgden wij de methoden door Magheru G. en A. en Creanga ¹²⁾ aangegeven. Allereerst bepaalden wij ons tot het onderzoek naar de *endotoxine insoluble* van Vincent.

TABEL I.

Stam	Endotoxine ensoluble			Endotoxine soluble		Stam	Endotoxine ensoluble			Endotoxine soluble	
	0,05	0,1	0,2	4	6		0,05	0,1	0,2	4	6
91	⊗	⊗	—	—	+	1636	⊗	⊗	—	—	+
67	—	+	+	—	+	1639a	⊗	⊗	—	⊗	—
144	—	+	+	⊗	—	1641	⊗	⊗	—	±	+
80	⊗	⊗	—	⊗	—	1645	⊗	⊗	—	⊗	—
B. Lam	⊗	⊗	—	⊗	—	1646	⊗	⊗	—	—	+
Franssen	⊗	⊗	—	⊗	—	1653	⊗	⊗	—	—	±
150	—	+	+	—	+	1654	⊗	⊗	—	—	+
6	⊗	⊗	—	⊗	—	1657	⊗	⊗	—	⊗	—
Wessels	⊗	⊗	—	⊗	—	1661	⊗	⊗	—	—	+
Bakhoven	⊗	⊗	—	⊗	—	57	⊗	—	+	—	—
Zuidwijk	⊗	—	+	⊗	—	671	⊗	⊗	—	⊗	—
1621	⊗	⊗	—	⊗	—	687	⊗	⊗	—	⊗	—
1628	⊗	⊗	—	⊗	—	688	⊗	⊗	—	⊗	—
1632	⊗	⊗	—	⊗	—	689	⊗	⊗	—	⊗	—
1635	⊗	⊗	—	⊗	—	693	⊗	—	+	⊗	—
1637	⊗	⊗	—	⊗	—	694	⊗	⊗	—	⊗	—
1640	⊗	⊗	—	⊗	—	909	⊗	⊗	—	⊗	—
72	—	—	±	⊗	—	1650F	⊗	⊗	—	⊗	—
74	⊗	—	+	⊗	—	1660	⊗	—	+	⊗	—
82	⊗	⊗	—	—	+	1667	⊗	⊗	—	⊗	—
882	⊗	⊗	—	⊗	—	1627	⊗	⊗	—	—	+
						66	⊗	⊗	—	—	+

Verklaring der teekens:

⊕ het proefdier sterft binnen de aangegeven tijdruimte;

± het proefdier vertoont verschijnselen van intoxicatie, overlijdt echter niet;

— de injectie wordt zonder waarneembare verschijnselen verdragen;

⊗ de injectie wordt niet gegeven, aangezien de toediening van de hoogere doseering zonder bezwaar wordt verdragen.

Hiervoor werd uitgegaan van een 24 uur oude agarcultuur. Deze cultuur werd gesuspenseerd in 1 cm³ physiologische zout-solutie, waarna deze emulsie gedurende 1 uur op 100° werd verhit. Het in het verloop van dien tijd verdampte water werd weder aangevuld. Van de, op deze wijze bereide, emulsie werd 0,2 cm³ intraperitoneaal bij muizen ingespoten. De stammen werden als toxisch beschouwd, indien de muizen binnen 6 dagen stierven. Bleken de dieren met 0,2 cm³ van de emulsie te succombeeren, dan werd de proef herhaald met 0,1 cm³ van eenzelfde emulsie en bij positief uitvallen dezer proef met een hoeveelheid van 0,05 cm³. Het resultaat van dit onderzoek is, (zie tabel I) dat van de 43 stammen 3 stammen n.l. de Nrs. 67, 144 en 150 een toxine opleverden, die in een hoeveelheid van 0,1 cm³ de muizen doodde, terwijl 6 andere stammen, gemerkt Zuidwijk, 72, 74, 57, 693 en 1660 slechts in een hoeveelheid van 0,2 cm³ daartoe in staat waren. Bij de sectie der overleden muizen vonden wij een beeld geheel overeenkomende met dat door Demnitz en Scholz beschreven n.l. alleen een sterk vergrootte milt, maar verder geen afwijkingen.

Vervolgens hebben wij bij onze stammen nagegaan in hoeverre zij in staat waren ons de endotoxine soluble, de zgn. *enterotrope toxine* van Vincent, te leveren. Het uitgangspunt vormde hier een peptonbouilloncultuur van den te onderzoeken stam. Deze cultuur had 20 dagen bij broedstooftemperatuur gestaan. Deze bouilloncultuur werd gefiltreerd door een „Entkeimungsfilter” van de firma Seitz. Het zoo verkregen filtraat werd daarna bij marmotten intraperitoneaal ingespoten, aanvangende met een hoeveelheid van 6 cm³ om bij overlijden van het dier herhaald te worden met een hoeveelheid van 4 cm³. Het resultaat van dit onderzoek werd positief genoemd, indien de marmot binnen 4 dagen kwam te sterven. Het sectiebeeld was in deze gevallen nagenoeg geheel overeenkomend met dat, wat ons bij diphtherietoxine-intoxicatie zeer bekend is, n.l. vrij vocht in de borst- en buikholte, haemorrhagische darmaandoeningen en een sterke roodkleuring van den bijnier. Een afwijking, die wij bij diphtherietoxine-intoxicatie nog niet waarnamen, was bloeduitstortingen onder het slijmvlies van de maag.

Hier moeten wij opmerken, dat de roodheid van de bijnier niet, zooals Magheru en Creanga opmerken, pathognomisch

voor een vergiftiging met colitoxine kan beschouwd worden, daar deze afwijking bij diphtherietoxine-vergiftigingen ook regelmatig voorkomt.

Uit de tabel I blijkt, dat bij 12 van onze colistammen, n.l. de nrs. 91, 67, 150, 82, 1636, 1641, 1646, 1653, 1654, 1661, 1627 en 66, deze endotoxine soluble in een hoeveelheid van 6 cm³ aantoonbaar is. Slechts in één geval, n.l. bij stam 1641 is de hoeveelheid toxine voldoende om in een dosis van 4 cm³ reactie te verwekken. Van een verband met de eerstgenoemde toxine is niets waar te nemen, daar slechts in twee gevallen n.l. bij de stammen 67 en 150 de beide toxinen te zamen bij een stam werden aangetroffen.

Hierna zijn wij overgegaan tot de aantooning van de 3de toxine van Vincent, n.l. de exotoxine of zoogenaamde neurotrope toxine. Deze toxine zou bij den mensch zijn aangrijpingspunt vinden in het zenuwstelsel, reden waarom, zooals wij zagen, Vincent het antitoxische coliserum bij afwijkingen van dien aard met succes meent te hebben toegepast.

Voor deze toxine werd uitgegaan van een peptonbouilloncultuur, die 4 dagen heeft gegroeid. Weder werd deze bouillon door een E. K. gefiltreerd en daarna intraveneus bij konijnen ingespoten. De hoeveelheid waarmede werd aangevangen bedroeg 4 cm³, een hoeveelheid, die door Magheru en Creanga als minimum werd opgegeven, waarbij de exotoxine, wanneer aanwezig, zou werkzaam zijn. Het resultaat van dit onderzoek was zeer teleurstellend, daar van de 22 hierop onderzochte stammen slechts één een positief resultaat gaf, n.l. stam 91. Bij sectie van het konijn, dat met stam 91 was ingespoten, werden wij getroffen door het feit, dat het beeld een zuiver enterotroop karakter droeg. (Op grond van dit nagenoeg negatieve resultaat hebben wij eveneens getracht de aanwezigheid dezer exotoxine aan te toonen, door uitgaande van een verdunning van 1/20 van het zelfde bouillonfiltraat 0,1 cm³ intracerebraal bij marmotten in te spuiten. Het resultaat van 13 onderzoekingen, waaronder nu ook stam 91, was even teleurstellend, daar in geen enkel geval de marmot overleed.)

Gedachtig aan de mededeeling van Demnitz en Scholz, die ook geen verschil zagen in eigenschappen der verschillende door Vincent genoemde toxinen, meenden ook wij deze zienswijze te mogen overnemen, aangezien de verkregen sectiebeelden en bij

muizen en bij cavia's en bij konijnen met die van hen overeenkwamen. Wij besloten ons onderzoek verder in hun richting voort te zetten en te trachten door hun werkwijze te volgen stammen te vinden, die een voldoende werkzaam toxine zouden opleveren. Hierbij werden 48 uur oude agarculturen afgeschud met physiologische zoutsolutie en deze suspensie in vacuum gedroogd. Om deze drogingsperiode te bekorten, werd door ons eerst ingedampt in het apparaat van Faust-Heim bij een temperatuur van 50° . Hiertoe meenden wij gerechtigd te zijn, daar Weinberg en Krueger¹⁴⁾ bij de bereiding van hun coli-endotoxine de bacterie suspensie gedurende 4 dagen op 50° verhitten.

Daarna werd in vacuum gedroogd eerst boven calciumcarbonaat en daarna boven phosphorpentoxyde. Wanneer de massa volkomen droog was, werd er in een mortier een fijn poeder van gemaakt. Voor de bereiding van de toxineoplossing werd als volgt te werk gegaan. Het verkregen bacteriepoeder wordt nauwkeurig afgewogen en deze gewogen hoeveelheid wordt in een steriel fleschje met glasparels gebracht, waarna zooveel steriel aq. dest. wordt toegevoegd, dat op 1 gram drooggewicht 20 cm³ aq. dest. komt. Na $\frac{1}{2}$ uur schudden in een schudapparaat, waardoor een zoo gelijkmatig mogelijke suspensie ontstaat, laat men het fleschje gedurende 12—18 uur bij kamertemperatuur staan, in welken tijd de gedroogde bacillen worden geëxtraheerd. Vervolgens wordt gecentrifugeerd, waarbij de toxine vrij komt in de bovenstaande vloeistof. De waarde der toxiciteit dezer vloeistof wordt bepaald door intraveneuze injectie bij muizen van ± 14 gram in hoeveelheden van 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; en 0,001 cm³. Het resultaat van een onderzoek bij 22 stammen vindt men in tabel II.

In deze tabel komen slechts eenige uitvallers voor, n.l. bij Bakhoven en 1636, die wij meenen te moeten beschouwen als fouten der techniek, daar de intraveneuze injectie bij muizen daar wel aanleiding toe kan geven. Overigens blijken 4 extracten n.l. 150, Wessels, Bakhoven en 1632 een concentratie aan toxine te bezitten, die overeenkomt met de eisch die Demnitz en Scholz hieraan stellen, n.l. dat 0,01 cm³ nog bij intraveneuze injectie bij de muis tot den dood voert. Bij sectie dezer dieren werd alleen een zeer sterk vergrootte milt gevonden, zooals door de genoemde onderzoekers werd aangegeven.

TABEL II.

Stam	Toxine volgens Demnitz en Scholz					
	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001
91	+	+	+	—	—	—
67	+	+	±	—	—	—
144	+	+	—	—	—	—
80	+	+	+	—	—	—
B. Lam	+	—	—	—	—	—
150	+	+	+	+	—	—
6	+	+	—	—	—	—
Wessels	+	+	+	+	—	—
Bakhoven	+	—	+	+	—	—
Zuidwijk	+	+	—	—	—	—
1621	+	+	+	—	—	—
1628	+	—	—	—	●	⊗
1632	+	+	+	+	—	—
1635	+	+	+	—	—	—
1637	+	+	—	—	—	—
1640	+	+	+	—	—	—
72	+	+	—	—	—	—
74	+	+	—	—	—	—
82	+	+	—	—	—	—
882	+	+	—	—	—	—
1636	+	+	+	—	+	—
1646	+	+	—	—	—	—

Verklaring der teekens:

+

 het proefdier sterft binnen de aangegeven tijdruimte;

±

 het proefdier vertoont verschijnselen van intoxicatie, overlijdt echter niet;

⊗

 de injectie van deze doseering werd, als zijnde overbodig, niet toegediend.

Met de, op genoemde wijze geïsoleerde toxine der 4 colistammen als antigeen, stellen wij ons voor coliserum te bereiden, dat dan aan den eisch van een anti-toxisch coliserum zal kunnen voldoen. Waar het mogelijk is dit antitoxisch coliserum te titreeren volgens de methode, door Demnitz en Scholz ¹⁾ aangegeven, zoo zal het verdere onderzoek ons leeren of de gevonden toxine aan de daaraan gestelde eischen voldoet, waarop wij in een volgend artikel zullen terug komen.

Samenvatting.

Van een groot aantal colistammen wordt het toxinevormend vermogen, in den zin door Vincent aangegeven, onderzocht.

Hierbij blijkt, dat de drie door hem aangegeven toxines, n.l. de *endotoxine insoluble*, de *endotoxine soluble* en de *exotoxine* kunnen worden gevonden, doch dat het niet uit de, bij de proefdieren gevonden, afwijkingen af te leiden is dat men met drie verschillende toxines te doen heeft. Daarom wordt het onderzoek vervolgd in de richting door Demnitz en Scholz aangegeven, waarbij het gelukt 4 stammen te vinden, die in hun toxinevormend vermogen aan de, door deze laatste onderzoekers gestelde, eischen voldoen.

L I T E R A T U U R.

1. A. Demnitz en W. Scholz: Klin. Wochenschrift 1936, 15, 302;
 2. H. Vincent: C. R. des Acad. des Sciences Hebd. Paris 1925, 180, 1624;
 3. H. Vincent: Bull. de l'Acad. Med. 1929, 101, 393;
 4. H. Vincent: Surgery, Gynaecology and Obstetrics 1933, 66, 7;
 5. H. Vincent: Bull. de l'Acad. Med. 1930, 103. 431—440;
 6. H. Vincent: C. R. des Acad. des Sciences Hebd. Paris 1929, 189, 391;
 7. M. Katzenstein: Zbl. Chirurgie 1927, 24;
 8. J. Knopp: Zbl. Chirurgie 1928, 15;
 9. H. Kohler: Zbl. Chirurgie 1928, 39;
 10. M. Weinberg en A. R. Prévot: C. R. de S. de B. 1933, 113, 1029;
 11. B. P. B. Plantinga: Jahrb. f. Kinderheilkunde 1930, 121, 17;
 12. G. en A. Magheru en H. Creanga: C. R. de S. de B. 1934, 114, 564;
 13. H. Vincent: C. R. des Acad. des Sciences Hebd. Paris 1928, 187, 787;
 14. M. Weinberg en A. Krueger: C. R. de S. de B. 1936, 122, 1227.
-

Professor Dr. D. A. De Jong-Stichting.

Verslag over de verrichtingen en den toestand over het jaar 1936

In het verslagjaar werd het onderzoek van Dr. Schlemper over den z.g. „filtreerbaren vorm” van den tuberkelbacil, waarvan reeds in het verslag over 1935 melding is gemaakt, verder voortgezet. Van de verkregen resultaten deed Dr. Schlemper een voorloopige mededeeling in de op 17 October l.l. gehouden ledenvergadering der Maatschappij voor Diergeneeskunde. Hieraan kan worden toegevoegd, dat thans ook enkele zelf geïsoleerde bacillenstammen van menschelijken oorsprong in het onderzoek zijn ingeschakeld.

De inkomsten aan vaste bijdragen liepen eenigszins terug, doordat enkele personen hun tot nu toe verleenden steun verminderden of introkken. De bijdrage der Maatschappij voor Diergeneeskunde bleef gehandhaafd op 600.— gulden.

Als gevolg eener waardevermeerdering der effecten werd het verleden jaar hierop geleden koersverlies voor een groot gedeelte weer ingehaald, waardoor het totaalbezit der Stichting steeg tot f 17594.65 op 1 Januari 1937.

Op 31 December kwam aan het bestuur, door het overlijden van Dr. Dhont, zijn voorzitter te ontvallen, welke functie deze van de oprichting der Stichting af had bekleed. In de hierdoor ontstane open plaats werd, in de vergadering van 27 Januari 1937, voorzien door de benoeming van Dr. J. van der Hoeden te Utrecht als beheerder, terwijl Prof. de Josselin de Jong bereid werd bevonden om het voorzitterschap te aanvaarden. Deze laatste, welke op 1 Januari 1937 aan de beurt van aftreding is geweest, stelde zich voor een herbenoeming beschikbaar.

Na deze wijzigingen berust het beheer der Stichting thans bij de Heeren: Prof. Dr. R. de Josselin de Jong, voorzitter; Prof. Dr. W. C. de Graaff, Dr. J. van der Hoeden, Prof. C. F. van Oyen en Dr. H. J. van Nederveen (Neuhuyskade 61, Den Haag) secretaris-penningmeester.

De secretaris

H. J. VAN NEDERVEEN.

's-Gravenhage, Februari 1937.

Verslag der Vergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie,

gehouden Zaterdag 14 November 1936 in het Hygiënisch
Laboratorium der Rijks-Universiteit,
Catharijnesingel 59, te Utrecht.

Volgens de presentielijst zijn aanwezig 53 leden en 7 gasten.

De voorzitter, *Prof. Flu*, opent te half elf de vergadering en geeft het woord aan den *secretaris* ter mededeeling van de

Ingekomen stukken.

Deze zijn:

1. Het Geologisch Mijnbouwkundig Genootschap voor Nederland en Koloniën heeft de Vereeniging uitgenoodigd om mede te werken aan het tot stand komen van een „inventaris” der Nederlandsche boekerijen, wat betreft de daarin aanwezige tijdschriften, verslagen en verdere verzamelwerken, feestbundels enz., op het gebied der verschillende natuurwetenschappen. In beginsel heeft het bestuur zich tot die medewerking bereid verklaard. Op 4 Juni heeft te Leiden een vergadering plaats gehad van vertegenwoordigers der hiertoe uitgenoodigde vereenigingen; als gevolg hiervan is van *Dr. Pinkhof*, die een gedeelte der voorloopige regeling op zich heeft genomen, een verzoek ontvangen om een medisch lid der Vereeniging aan te wijzen, die in de commissie van voorbereiding de geneeskundige wetenschappen zou kunnen vertegenwoordigen. Als zoodanig is, met diens voorkennis, door het bestuur opgegeven *Prof. Snijders*.

2. Van de Nederlandsche Centrale Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek is het verslag ontvangen over 1935.

3. De secretaris der Botanische Sectie van de Internationale Unie van Biologische Wetenschappen heeft een aanvraag ingezonden om gegevens betreffende de Vereeniging; deze zijn inmiddels opgenomen in het 2e deel van de door deze Unie uitgegeven „*Chronica Botanica*” over 1936.

Deze punten geven geen aanleiding tot bespreking.

Verder zijn ingekomen:

4. Van den secretaris van het Nederlandsch Congres voor Openbare Gezondheidsregeling de uitnoodiging om als „deelnemende vereeniging” tot dit Congres toe te treden; de kosten hiervan bedragen f5.— per jaar, waarvoor twee bestuursleden de vergaderingen kunnen bijwonen en de „Handelingen” worden verkregen. Dit wordt voor kennisgeving aangenomen.

5. Van de redactie van het Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde een ontwerp-rooster voor vergaderingen van vereenigingen op het gebied der geneeskunde. Als dag voor de vergadering der Nederl. Vereeniging voor Microbiologie wordt daarin voorgesteld Zaterdag 10 April 1937. In verband met een van *Prof. Westerdijk* ontvangen uitnoodiging de zomervergadering in Baarn te houden, wordt besloten deze te bepalen op Zaterdag 22 Mei e.k.

Hiervan zal aan de genoemde redactie kennis worden gegeven.

Van *Prof. Wolff* is nog de mededeeling ontvangen, dat hij door ongesteldheid niet tegenwoordig kan zijn, terwijl, na het drukken van het programma, *Dr. van der Walle* heeft verzocht hem gelegenheid te geven tot het houden van een voordracht over „Staphylolipasen”.

De verhouding der Vereeniging ten opzichte van de Internationale Vereeniging voor Microbiologie.

In verband met hetgeen over dit punt in de vorige vergadering is gesproken, deelt de *voorzitter* mede, dat ter gelegenheid van het dezen zomer te Londen gehouden congres, door het bestuur der Internationale Vereeniging een vergadering is belegd met *Prof. Kluyver* als vertegenwoordiger voor ons land, wien hij verzoekt over het daar behandelde wel eenige inlichtingen te willen geven.

Prof. Kluyver zegt, dat hij bij afwezigheid van *Prof. Alders-hoff* tot bijwoning was uitgenoodigd. Voorgesteld werd aanvankelijk om de geheele vereeniging op te heffen. Hiertegen werd vooral van Fransche en van Belgische zijde bezwaar gemaakt: men achtte het om den indruk, dien dit naar buiten zou maken, vooral in dezen tijd bedenkelijk om een internationale organisatie

te ontbinden. Besloten is toen deze, met zekere wijzigingen, onder den naam van „Internationaal Congres voor Mibrobiologie” te laten voortbestaan met het uitsluitend doel congressen te houden. In de verschillende landen zullen dan, door bestaande of op te richten nationale comité's, vertegenwoordigers in het centrale bestuur kunnen worden aangewezen.

Prof. Kluyver heeft toen bepleit, dat ook een vereeniging in de plaats van een nationaal comité zal kunnen treden, waarmede men zich heeft vereenigd. Waar hij het voor ons land het meest gewenscht acht, dat de vertegenwoordiging bij onze Vereeniging berust, meent spreker, dat er geen bezwaar bestaat wanneer deze een vertegenwoordiger zou benoemen; vooropgesteld, dat *Prof. Aldershoff* zich als zoodanig terugtrekt en het hier te lande bestaande comité zich als ontbonden zou beschouwen.

Na eenige verdere gedachtenwisseling neemt *Prof. Kluyver* op zich, hiernaar onderzoek te doen en zich met *Dr. Timmerman* in verbinding te stellen; daarna kunnen verdere stappen volgen.

Benoeming kascommissie.

Tot leden der kascommissie over 1936 worden benoemd *Dr. Julius* en *Dr. Pondman*, die zich ook het vorig jaar met het nazien van het beheer hebben belast.

Verkiezing bestuurslid en benoeming secretaris.

Dit jaar is de secretaris aan de beurt van aftrèding; deze is reeds éénmaal herbenoemd en derhalve, ingevolge het bepaalde in art. 12 der Statuten, niet herkiesbaar.

De *voorzitter* zegt, dat hij op *Dr. van Nederveen* aandrang heeft uitgeoefend om hem voor het bestuur te behouden; dit is echter niet gelukt, zoodat tot benoeming van een nieuw bestuurslid en een nieuwen secretaris moest worden besloten.

Alvorens hiertoe over te gaan, brengt hij den aftredende dank voor hetgeen deze in een 11-jarige zittingsperiode voor de Vereeniging heeft gedaan. Een secretaris is als een vooruitziende post in een vereeniging en heeft als zoodanig grooten invloed op den gang van zaken. Dat deze in onze Vereeniging, ook in dezen tijd, zoo weinig te wenschen overlaat, is voor een groot deel aan den aftredenden secretaris te danken, waarvoor hij hem hier namens de Vereeniging dank zegt.

De leden geven van hunne instemming met het gesprokene blijk.

Bij de nu volgende verkiezing worden, op voorstel van het bestuur, benoemd tot nieuw bestuurslid *Dr. L. E. Den Dooren de Jong* en tot secretaris *Dr. T. Folpmers*, die reeds in het bestuur zitting heeft. Beide heeren nemen hunne benoeming aan.

De *secretaris* dankt daarna *Prof. Flu* voor zijn vriendelijke woorden en de vergadering voor haar blijk van instemming. Het stemt hem tot voldoening, dat, bij zijn heengaan uit het bestuur, het ledental der Vereeniging, na een inzinking onder invloed der crisisjaren, zich weer in een langzaam stijgende lijn beweegt. Hij brengt vervolgens dank aan de afgetreden en aan de thans zittende bestuursleden voor de vriendschappelijke wijze, waarmede hij steeds met hen heeft mogen samenwerken, en aan de leden, dat zij hem steeds hebben geholpen om een degelijk en goedgevuld programma samen te stellen en ook voor den prettigen geest, waardoor de vergaderingen altijd waren gekenmerkt. Na verder zijn erkentelijkheid te hebben betuigd aan den uitgever van het huidige orgaan der Vereeniging, de *N.V. Swets en Zeitlinger* te Amsterdam, voor de tegemoetkomende wijze, waarop deze steeds met de wenschen van het bestuur rekening heeft gehouden, spreekt hij den wensch uit, dat zijn opvolger evenveel genoegen aan de waarneming van het secretariaat zal beleven als hij zelf en de Vereeniging zich in een steeds toenemenden bloei zal mogen verheugen.

Zomervergadering.

Zooals reeds hiervoren is vermeld, zal de zomervergadering, na ontvangen uitnoodiging van *Prof. Westerdijk*, te Baarn worden gehouden op *Zaterdag 22 Mei e.k.*

Bij de *Rondvraag* verlangt niemand het woord, zoodat wordt overgegaan tot behandeling van het

Wetenschappelijk Gedeelte.

Dr. P. H. van Thiel spreekt hierin over: *De levensduur van Leptospira icterohaemorrhagiae in oppervlaktewater.*

Proeven over den levensduur van den verwekker van de ziekte van Weil in oppervlaktewater zijn tot nu toe slechts verricht door op het laboratorium in reageerbuisen water met cul-

tuur der spirochaeten samen te brengen. Deze proeven leeren evenwel niets over den toestand in de natuur en over het behoud van het besmettend vermogen der spirochaeten.

In verband hiermede is een aantal proeven verricht volgens de „badmethode” met behulp van een 1 M. diepen houten bak, die, met besmet oppervlakte water gevuld, in buitenwater werd geplaatst. Na 6 dagen bleken de spirochaeten uit de meer oppervlakkige lagen geheel of voor het grootste gedeelte verdwenen te zijn, maar nog na 22 dagen (midden in het badseizoen) in de diepere lagen, op of bij den bodem, aanwezig te zijn zonder iets van hun virulentie verloren te hebben.

De nabijheid van modder schaadt de leptospirae niet. Ook kunnen deze organismen grootere vervuiling van het water verdragen dan tot nu toe kon worden verondersteld. Ons inzicht in de epidemiologie der ziekte van Weil wordt door een en ander beïnvloed.

Bespreking.

Prof. Schüffner vraagt inlichting omtrent het bestaan van antagonisme tusschen leptospirae en pseudo-leptospirae.

Spreker meent, dat dit antagonisme zich in de natuur niet voordoet maar alleen een waarneming is in het cultuurbuisje, over de verklaring waarvan men in het duister tast.

Dr. Folpmers vraagt, of er ook organismen zijn, die de leptospirae opeten.

Spreker antwoordt, dat hij hierover proeven heeft genomen met protozoën en ciliaten, welke proeven hij niet tot een goed einde heeft kunnen brengen.

Mevrouw Walch merkt op, dat leptospirae het ook bij verschillende P_H lang kunnen uithouden; eerst langzamerhand treedt verschil op. Bij P_H van 7.5 is de groei het best, bij zure reactie wordt deze slechter.

Prof. Flu vraagt, of het niet mogelijk is geweest, dat de proefbak tusschentijds door ratten is besmet.

Spreker kan deze mogelijkheid niet geheel ontkennen maar acht dit toch zeer onwaarschijnlijk, omdat dan het water wel op zeer intensieve wijze zou moeten zijn besmet.

De heer *J. Mulder* houdt vervolgens een voordracht over: *De huidige stand van het vraagstuk der septische influenza-*

meningitis, welke voordracht in haar geheel in dit Tijdschrift wordt opgenomen.

Naar aanleiding van de bij de bespreking gestelde vraag over de mogelijkheid eener serumbehandeling, deelt *Dr. Pondman* mede, dat *Dr. Timmerman* reeds in die richting werkzaam is geweest en met verschillende stammen een serum heeft bereid. Over de waarde hiervan kan nog geen oordeel worden uitgesproken.

Dr. N. van der Walle krijgt daarna het woord ter inleiding van het onderwerp: *Staphylolipasen*. Deze voordracht wordt in het Tijdschrift opgenomen:

Bij de *bespreking* maakt *Prof. Smit* enkele technische opmerkingen en beveelt aan om de vetplaten te bereiden door deze met vet te overgieten en dit te laten afloopen; er blijven dan eenige druppels achter, die een zeer dunne laag vormen.

Prof. Kluyver zegt, dat het vooral ook afhangt van de wijze, waarop de bacterie groeit, of al dan niet lipasen worden afgescheiden; zoo vormen sommige wel lipasen in anaërobe, echter niet in aërobe kweek. Hij geeft in overweging de uitvallers ook eens in die richting te onderzoeken.

Na gebruik van het noemenmaal in het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, daartoe door *Dr. Timmerman* welwillend ter beschikking gesteld, spreekt in de middagvergadering

de heer *R. Stoop* over: *De filtreerbare elementen van den tuberkelbacil*. Deze voordracht wordt in dit Tijdschrift in haar geheel geplaatst.

Bespreking.

Prof. de Graaff merkt op, dat het voorkomen van spontane tuberculose bij de cavia oorzaak is geweest van veel verwarring; hij vraagt zich af, of het niet mogelijk is, dat bij de z.g. positieve waarnemingen een spontaan proces door het acetonextract is geactiveerd.

Prof. Flu zegt op zijn laboratorium een geval van spontane tuberculose bij de cavia te hebben waargenomen; dit is echter groote uitzondering.

Na eenige verdere gedachtenwisseling merkt *spreker* in zijn

antwoord op, dat men tegenwoordig ook aan het Instituut Pasteur zeer sceptisch tegenover deze heele kwestie staat.

De heer *G. Giesberger* houdt daarna een voordracht over: *Eenige tot het geslacht Spirillum behorende soorten.*

In het kort wordt de wijze besproken, waarop enkele der in de natuur voorkomende Spirillum-soorten opgehoopt en in rein-cultuur kunnen worden gebracht. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van de morphologische en de physiologische eigenschappen van een vijftal verschillende door spreker afgezonderde soorten. Een en ander wordt met behulp van microphotographieën nader verduidelijkt. In verband met de aanpassing van spirillen aan een zuurstofspanning welke lager is dan die van in de lucht, werden de ademhalingsprocessen van een aantal Spirillum-soorten met behulp van de Warburg-methodiek bestudeerd. Het bleek bij een nader onderzoek van de oxydatieve verwerking van een aantal organische verbindingen, dat ondanks de afwezigheid van verschillende voor den normalen groei noodzakelijke factoren, naast de ademhaling toch nog altijd assimilatorische processen plaats vinden. Deze proefnemingen leiden tot de conclusie, dat het bij den huidige stand van onze kennis niet mogelijk is om een experimenteele scheiding tusschen ademhaling en assimilatie door te voeren.

Bespreking.

In antwoord op een vraag van *Prof. Smit* deelt *spreker* mede, dat de vorm der spirillen zeer sterk afhankelijk is van den voedingsbodem, niet wat betreft de lengte maar wel met betrekking tot de windingen; verder naar aanleiding van een vraag van *Dr. van der Walle*, dat zij niet flexibel zijn en, in een antwoord aan *Ir. van Schouwenburg*, dat het nog lang niet is gelukt om alle waargenomen spirillen af te zonderen en dat van pathogeniteit nooit iets is gemerkt.

Prof. A. J. Kluyver deelt hierna, als laatste spreker, namens *Dr. H. A. Barker* (Berkeley, Californië) een en ander mede aangaande diens in het Delftsche Laboratorium voor Microbiologie verrichte *Onderzoekingen over de methaangisting.*

Spreker wijst allereerst op de groote beteekenis van dit gistingsproces, zoowel voor den kringloop van de stof in de

natuur, als ook in technisch opzicht. Wat dit laatste aangaat, moge er de aandacht op worden gevestigd, dat de hier te lande omstreeks 1910 voor het eerst door den tegenwoordigen Directeur van het Rijks Instituut voor Zuivering van Afvalwater, *Ir. Kessener*, op kleine schaal uitgewerkte methode van biologische afvalwaterreiniging met methaanwinning, heden ten dage in het buitenland in steeds toenemende mate toepassing vindt.

Aan wijlen den Wageningschen hoogleeraar *Söhngen* danken wij de eerste meer fundamenteele onderzoekingen aangaande de methaan-produceerende micro-organismen, alsmede aangaande den aard der door deze bewerkte chemische omzettingen. Deze, nu reeds 30 jaren geleden verrichte, onderzoekingen zijn thans door *Dr. Barker* in verschillend opzicht uitgebreid. Duidelijk trad hierbij nog eens aan het licht, dat het slijk onzer kanalen, riolen e.d. een zeer gevarieerde wereld van methaan-produceerende bacteriën, met grootendeels nog onbekende eigenschappen, herbergt. De extreme anaërobie (luchtschuwhed) van deze organismen heeft tot dusver hun rein-cultuur in het laboratorium verhinderd; door *Dr. Barker* zijn thans methoden uitgewerkt, welke ons in staat stellen koloniën dezer organismen in vaste voedingsmedia te verkrijgen, hetgeen een zekere herkenning der in bepaalde gevallen werkzame micro-organismen mogelijk maakt.

De door *Dr. Barker* ingestelde onderzoekingen hebben evenwel ook op het chemisme van het methaan-produceerende proces een geheel nieuw en verrassend licht geworpen. Zich baseerende op de waarneming van *Söhngen*, dat ruwcultures van methaan-produceerende bacteriën een mengsel van koolzuur en waterstof practisch volledig in methaan en water omzetten, was door *Dr. Barker's* leermeester, den Hollandsch-Amerikaanschen hoogleeraar *Van Niel*, de hypothese opgesteld, dat in alle gevallen het gevormde methaan door reductie van koolzuur zou ontstaan. De oogenschijnlijk tot methaan „vergiste” organische verbindingen zouden in werkelijkheid slechts waterstofleveranciers zijn voor de reductie van gelijktijdig in het medium aanwezig koolzuur. De juistheid dezer voorstelling, waarvoor a priori reeds vele argumenten pleitten, is thans door *Dr. Barker* voor bepaalde gevallen rechtstreeks experimenteel bewezen.

Doordat zodoende het proces der methaangisting in wezen is teruggebracht tot een biochemische carbonaat-reductie komt

dit proces geheel op één lijn te staan met de reeds van oudsher bekende biologische processen van nitraat- en sulfaat-reductie. In de bij deze processen onderscheidenlijk gevormde methaan, ammoniak en zwavelwaterstof ontmoeten wij de hoogste reductietrappen der elementen koolstof, stikstof en zwavel.

Ook na deze voordracht vindt eenige gedachtenwisseling plaats.

Niets meer aan de orde zijnde, sluit de *voorzitter*, onder dank aan *Dr. Julius* bij afwezigheid van *Prof. Wolff* voor de ondervonden gastvrijheid, te half vijf de vergadering.

's-Gravenhage, November 1936.

De secretaris
H. J. VAN NEDERVEEN.

Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden;

voortzetting van een onderzoek van wijlen Prof. Dr. Ir. N. L. SÖHNGEN

DOOR

K. T. WIERINGA *).

Nu 30 jaar geleden werd door Söhngen waargenomen, dat in de methaangisting der vetzure zouten waterstof kan worden geabsorbeerd. Deze waarneming leidde hem tot de conclusie, dat koolzuur- en waterstofgas onder anaerobe voorwaarden tot methaan en water kunnen worden omgezet. De eenige verklaring voor het waargenomen feit is inderdaad, dat het bij de gisting gevormde koolzuur met de toegevoegde waterstof overgaat in methaan en water. Schematisch kunnen wij de achtereenvolgende processen als volgt formuleeren:

$\text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ welke reacties gesommeerd
leiden tot: $\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

Inderdaad bleek bij de proefnemingen een mengsel van waterstof en koolzuur in de theoretisch verwachte verhouding te worden omgezet. In 14 dagen verdween 1191 cm^3 waterstofgas en 300 cm^3 koolzuurgas. Hieruit waren 285 cm^3 methaan gevormd, waarvoor 1140 cm^3 waterstof noodig waren, zoodat $51 \text{ cm}^3 \text{ H}_2$ op onverklaarbare wijze verdwenen waren. Eveneens was ongeveer 5% van het verdwenen koolzuurgas niet terug te vinden. Söhngen achtte het waarschijnlijk dat deze gassen voor voeding van de bacteriën waren verbruikt.

Ondanks de vele pogingen die Söhngen bij zijn onderzoek in het werk stelde om tot de reincultuur van de methaanvormende organismen te komen, gelukte hem dit niet. Wel was het

*) Voordracht gehouden in de vergadering v. d. Ned. Vereen. v. Microbiologie op 23 Mei 1936.

waarschijnlijk, dat twee verschillende organismen nl. een sarcine en een staafbacterie in zijn culturen als agens moeten worden beschouwd. Terwijl in de acetaat gisting de sarcine meer op den voorgrond treedt, vindt men bij de gisting der overige zouten in hoofdzaak de staafbacterie. Dat de reincultuur van deze organismen niet gelukte, is wel in hoofdzaak toe te schrijven aan de omstandigheid, dat overentingen met kleine hoeveelheden entmateriaal niet aanslaan, terwijl op platen nimmer groei werd waargenomen, noch van de sarcine, noch van de staafbacterie. In zijn proefschrift uit Söhnngen zich hierover slechts kort. De hoeveelheid werk, die hij aan dit deel van zijn onderzoek heeft verricht, moet echter niet onderschat worden ¹⁾. Ook later heeft hij nog herhaalde malen getracht de reincultuur van de methaangebacteriën te verkrijgen. Hierbij werden hetzij veranderingen in het substraat aangebracht, hetzij de physische groeivoorwaarden gewijzigd. Ook het werk van zijn leerling Coolhaas ²⁾ over thermophile gistingen kan als een poging in deze richting worden beschouwd.

Eenigen tijd vóór zijn dood heeft Söhnngen het onderzoek der methaangistingen nogmaals ter hand genomen. Het oogen-schijnlijk zoo selectieve substraat, bestaande uit een mengsel van waterstof en koolzuurgas werd hierbij als uitgangspunt gekozen.

Om dit proces met goed gevolg te kunnen bestudeeren is het noodig, dat de snelheid van de omzetting zeer groot is. Tevens is een geschikt apparaat noodig, waarmee het mogelijk is de samenstelling der gassen te controleeren en het verloop van het proces zoowel kwantitatief als kwalitatief te vervolgen. Ook moet het geheel steriliseerbaar zijn, gemakkelijk te vullen met voedingsvloei-stof, entmateriaal en gassen, terwijl tevens monstertjes genomen moeten kunnen worden voor het microscopisch onderzoek en de overentingen, zonder dat de inhoud van de kolf daarbij geïnfecteerd wordt.

Het prototype van de uiteindelijk gekozen apparatuur is een fractioneer-kolf met zijbuis, voorzien van een dubbel doorboorde gummistop, waardoor twee buizen steken. De eene buis eindigt in den bol van de kolf, ongeveer op halve hoogte; de andere eindigt vlak onder de stop. Deze laatste buis, die dient om druk-

¹⁾ N. L. Söhnngen. Diss. Delft, 1906.

²⁾ C. Koolhaas. Diss. Wageningen, 1927.

veranderingen in de kolf te constateeren, is omgebogen en loopt langs den hals en den bol van de kolf. De eerste buis dient zoowel voor het toedienen van gas als voor het nemen van gas- en vloeistofmonsters; ze wordt voortaan als analysebuis aangeduid. De zijbuis van de fractioneerkolf wordt gebruikt voor de vulling en voor het enten. Alle drie buizen kunnen met kranen worden afgesloten en zijn van wattenfilters voorzien. Bij de definitieve uitvoering is het apparaat uit Jenaglas glas gemaakt en bestaat uit één stuk, behalve het wattenfilter van de analysebuis, dat met dikwandige gummieslang aan het toestel is verbonden. (Zie foto 1). De inhoud van het toestel bedraagt 2.5 L. Hiervan wordt 1 L. door de vloeistof ingenomen, zoodat 1.5 L. voor het gasmengsel over blijft.

De analysebuis is zoodanig aangebracht, dat bij omgekeerden stand van de kolf de buis naar believen boven de vloeistof uitsteekt of geheel is ondergedompeld, zoodat zoowel gas als vloeistof kan worden afgetapt.

De cultuurvloeistof, die oorspronkelijk een zeer eenvoudige samenstelling had, onderging in den loop van het onderzoek belangrijke wijzigingen, zoodat tenslotte de oplossing als volgt werd samengesteld:

Aan een extract van slootmodder wordt 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NH_4Cl , en 0.1% $MgSO_4$ toegevoegd benevens 0.001% $FeSO_4$. 1 L. modderextract wordt bereid uit 100 g gedroogde modder, die vooraf met benzine is geextraheerd. Wanneer de in de modder achter gebleven benzine verdampt is, wordt de modder geschud met 1 L. water en 40 tot 60 gram $NaHCO_3$. De vloeistof wordt nu afgefilterd en de modder met water nagewasschen tot 1 L. extract is verkregen. Deze vloeistof wordt nu door een filterkaars geperst en in een steriele kolf opgevangen, waarin zich reeds de genoemde zouten bevinden. Door achtereenvolgens leegpompen en vullen met waterstof wordt de ruimte boven de vloeistof anaeroob gemaakt. Daarna worden nog 8 tot 10 cm³ n/10 H_2S -water toegevoegd en tenslotte kan men het gewenschte gasmengsel aanbrengen. De kolf is nu gereed voor de enting.

Het H_2S -water, oorspronkelijk gebruikt om ongewenschte microben te onderdrukken, bleek later zooal niet noodzakelijk, dan toch zeer gewenscht te zijn voor een vlot verloop van het proces. Dit moet deels worden toegeschreven aan het behoud

van een anaeroob milieu, deels aan het colloidaal neergeslagen FeS. (Zie hierover ³⁾ en ⁴⁾.)

Aanvankelijk werd aan de ruwculturen, die met 10 tot 100 gram modder werden aangezet, slechts weinig Natriumcarbonaat toegevoegd. De bedoeling hiervan was om door alkalische reactie het milieu meer selectief te maken. Het bicarbonaat werkte zeer gunstig op de snelheid der omzetting; daarom werd geleidelijk meer bicarbonaat toegevoegd. Bij overentingen werd tenslotte de modder vervangen door een extract, dat op bovengemschreven wijze vervaardigd was. Tot deze werkwijze werd overgegaan, nadat gebleken was, dat gesteriliseerde modder minder goed werkte. Door de voorafgaande extractie met benzine worden wassen uit de modder verwijderd, tengevolge waarvan de extractie met Na-bicarbonaat beter gelukt.

De toevoeging van groote hoeveelheden bicarbonaat brengt met zich mede, dat aan het gas boven de vloeistof althans in het begin geen koolzuur behoeft te worden toegevoegd. Wij gaven dan ook uitsluitend waterstof. Met een gaspijet wordt een geringe overdruk aan waterstof gegeven.

Van bijzondere beteekenis voor de snelheid, waarmee het proces verloopt, is het schudden. De technische moeilijkheden verbonden aan het schudden van een eenigszins groot aantal van dergelijke cultuurkolven werden opgelost, door de kolven op een schuingeplaatste draaiende schijf te bevestigen. In een betrekkelijk klein bestek en met slechts een geringe kracht konden zodoende 16 kolven van elk 2.5 L. inhoud in een draaiende en schommelende beweging gehouden worden. (foto 2).

Het is begrijpelijk, dat deze methode eerst na vele experimenten als de meest bevredigende werd gevonden. Een voorbeeld van een ruwcultuur is b.v. No. 164. 1 L. cultuurvloeistof bevatte 50 cm³ grondextract, 50 g NaHCO₃, 1 g Na₂SO₄, 300 mg K₂HPO₄, 100 mg NH₄Cl, 25 mg MgCl₂ en een spoortje MnSO₄ en FeSO₄; bovendien nog 8 cm³ n/10 H₂S-water. Het gasmengsel bestond uit 1.5 L H₂ en 200 cm³ CO₂. De cultuur werd op 25 April 1934 met een flinke hoeveelheid grachtmodder geënt. Deze cultuur werd 1 jaar lang aangehouden. In graphiek I en tabel I is

³⁾ R. Lieske und E. Hofmann, Zeitschr. „Brennstoff Chemie“, Bd. 11 (1930).

⁴⁾ Fischer, Lieske u. Winzer, Biochem. Zeitschr. 236 en 245.

TABEL I. No. 164. Samenstelling van het milieu:

50 g. grondextract, 50 g. NaHCO_3 , 1 g. Na_2SO_4 , 300 mg. K_2HPO_4 , MgCl_2 , NH_4Cl , Sp. MnSO_4 , FeSO_4 , 8 cc. n/10 H_2S , 1500 cc. H_2 , 200 cc. CO_2 .

Geënt met 58 cm^3 grachtmodder 25/4 1934.

Dat.	$\text{cm}^3 \text{H}_2$	$\text{cm}^3 \text{CO}_2$	Dat.	$\text{cm}^3 \text{H}_2$	$\text{cm}^3 \text{CO}_2$	Dat.	$\text{cm}^3 \text{H}_2$	$\text{cm}^3 \text{CO}_2$
29. 4	120	—	8. 5	850	300	15. 5	400	100
1. 5	100	—	„ 3 u.	300	—	16. 5	320	200
2. 5	800	200	9. 5	930	400	17. 5	220	100
3. 5	840	—	10. 5	950	300	18. 5	150	—
„ 5 u.	550	400	11. 5	800	300	19. 5	150	—
4. 5	800	300	„ 5 u.	100	—	Gasanalyse		
5. 5	850	300	12. 5	650	200			
6. 5	770	200	13. 5	680	200	Dat.	% CO_2	% CH_4
7. 5	600	200	14. 5	580	200			
20. 5	780	300	26. 5	660	300	7. 5	23.4	2.8
21. 5	500	200	27. 5	680	300	12. 5	22.7	34.2
22. 5	500	200	28. 5	450	200	19. 5	25.7	66.9
23. 5	380	200	29. 5	380	200	25. 5	21.6	75.2
24. 5	260	100	30. 5	200	100			
25. 5	250	100	31. 5	200	—			
			1. 6	150	—			

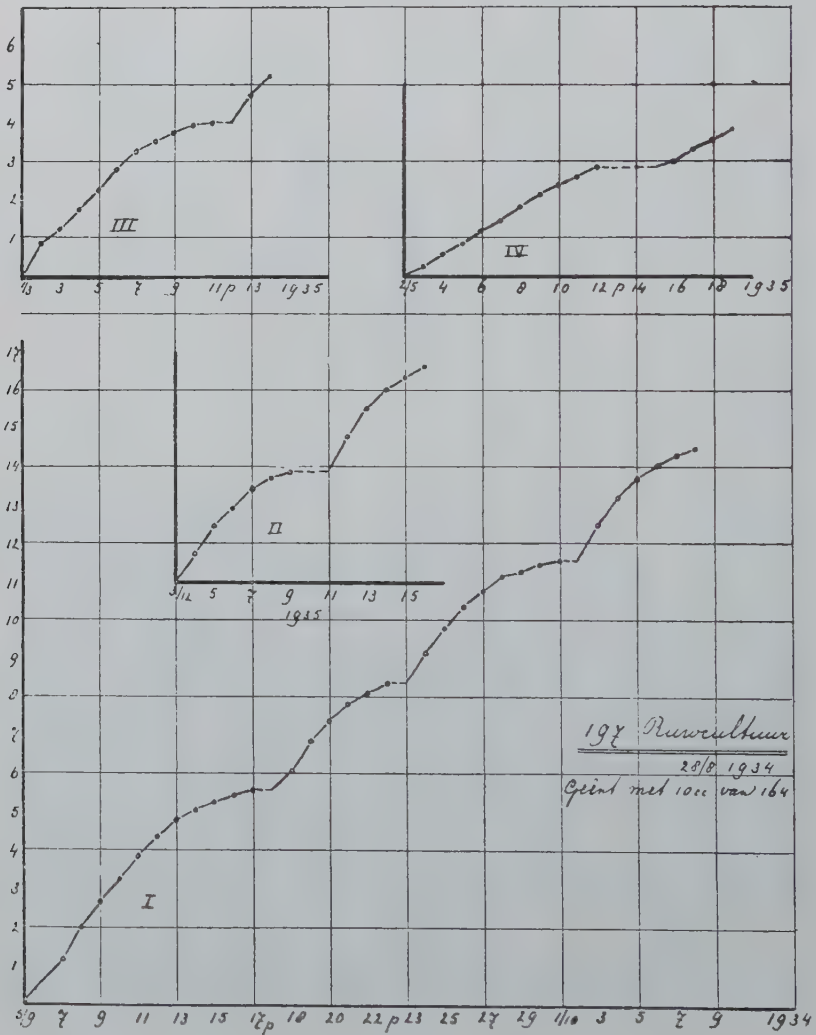
het verloop van het waterstofverbruik in de beginperiode uitgezet.

Uit de analyse van het in de kolf achterblijvende gas op verschillende tijdstippen ziet men, dat in het begin ondanks een zeer ruim gebruik van waterstof slechts zeer weinig CH_4 gevormd is. Terwijl op 7 Mei reeds ruim 5 L H_2 verdwenen is, bevat het van CO_2 bevrijde gas in de kolf nog slechts 2.8% CH_4 . Het grootste deel van de waterstof moet dus volgens een andere weg omgezet zijn. Na de analyse werd de kolf leeggepompt en opnieuw gevuld met H_2 en CO_2 . Dit leegpompen is telkens herhaald als de drukvermindering afnam tengevolge van de toename van het CH_4 -gehalte. Het CH_4 -gehalte steeg in het vervolg steeds hoger en bereikte tenslotte ruim 75% van het CO_2 -vrije gas. Een overeenkomstig beeld van het verloop der methaanvorming werd in alle ruwculturen gevonden. (Zie graphiek II).

De culturen 200 en 205 laten ons zien, wat er in het begin met de waterstof gebeurt. De voedingsoplossing bevatte de gewone minerale zouten, 50 g NaHCO_3 , 48 cm^3 n/10 H_2S -water,

200 cm³ modderextract. Nadat de kolven gevuld waren met H₂ bij gewonen druk, werd nog 200 cm³ CO₂ bijgeperst. No. 200 werd op 4 Sept. 1934 geënt met een oogje van No. 194 op een oogenblik, dat deze cultuur nog geen methaan gevormd had. Na verloop van 13 dagen was in No. 200 de gisting op gang, ondanks de zwakke enting. Toen nu op verschillende tijdstippen het gas werd geanalyseerd, bleek dat geen CH₄ werd gevormd. Zelfs

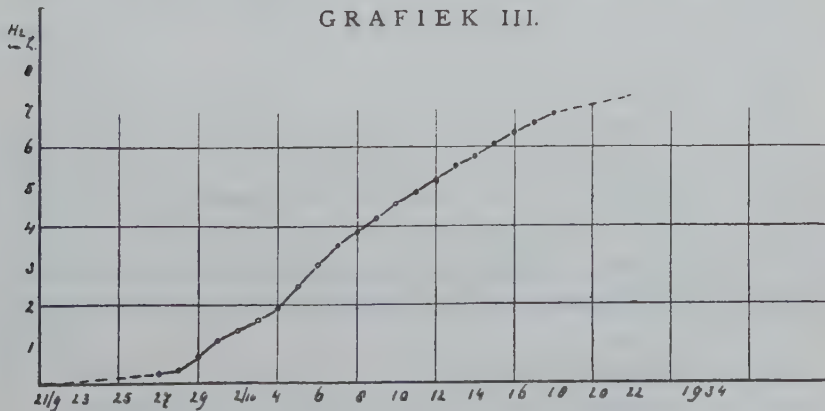
GRAFIEK II.

H₂ in %.

was nog geen spoor methaan aanwezig, nadat reeds 17,480 L. waterstof was verbruikt. Op 21 Sept. werd 205 op gelijke wijze met een oogje van 200 geënt. Ook in deze cultuur, die na 6 dagen op gang ging, was na 1 maand nog geen methaan aanwezig. (Zie tabel II en graphiek III).

TABEL II. No. 205, 21/9 geënt met 2 oogjes van No. 200.

Datum	Toegediend gas		
	H ₂	CO ₂	
21. 9	1500	200	Mineraalzouten als vroeger;
27. 9	310	—	
28. 9	50	—	
29. 9	360	—	50 gr. NaHCO ₃
30. 10	340	—	
1. 10	250	—	
2. 10	280	—	300 cm ³ modderextract
3. 10	340	—	
5. 10	540	—	
6. 10	500	—	Het gas geanalyseerd op 22/10 bevatte 1.1 % CO ₂ , geen methaan en ruim 90 % waterstof.
7. 10	500	—	
8. 10	380	—	
9. 10	360	—	
10. 10	370	—	
11. 10	250	—	
12. 10	300	—	
13. 10	320	—	
14. 10	280	—	
15. 10	310	—	
16. 10	300	—	
17. 10	180	—	
18. 10	230	—	



Echter was de titer, die aanvankelijk per 5 cm³ voedingsoplossing 24,2 cm³ n/10 zuur bedroeg gedaald tot 18,5 cm³. Er was dus een flinke hoeveelheid zuur gevormd. Indien men een dergelijke cultuur afdestilleert, dan gaat een zure vloeistof over, die bij analyse naast veel azijnzuur slechts sporen mierenzuur blijkt te bevatten.

Door Lieske en Hoffmann ³⁾ was reeds in 1930 aangetoond dat CO langs biologischen weg tot CH₄ kon worden omgezet. Hierbij ontstond als tusschenproduct CO₂. In een tweede publicatie deelen Fischer, Lieske en Winzer ⁵⁾ mee, dat als tweede tusschenproduct der methaanvorming azijnzuur is gevonden. Over de microörganismen, die deze processen veroorzaken schrijven zij niet ⁵⁾.

Dat de vorming van azijnzuur van die van methaan gescheiden kan worden is door onze onderzoekingen bewezen. Alle overentingen van No. 200, de Nos. 205 t/m 208 bleven vrij van methaan. Ook nog op andere wijze kan men de azijnzuurvorming van de methaangisting scheiden. Bij microscopisch onderzoek van de culturen was het opgevallen, dat deze culturen veel sporenvormers bevatten. Daarom werd overgegaan tot pasteurisatie van het entmateriaal. No. 214 werd 29 Oct. 1934 met 10 cm³ van 206 geënt; het entmateriaal was gedurende 10 minuten op 70° verhit. Na 12 dagen begon in deze kolf de waterstofabsorbtie, waarbij op 27 Nov. 1934 nog geen methaan gevonden werd. Er waren op dat oogenblik 13 L. waterstof geabsorbeerd. Het pasteuriseeren biedt de grootste zekerheid, dat een cultuur verkregen wordt, die niet naar methaanvorming terugslaat. Eenmaal pasteuriseeren gedurende 10 minuten op 75° C. waarborgt volledige uitschakeling van de methaangisting. Zoolang nog geen reinculturen waren verkregen, werd deze methode dan ook toegepast. No. 260, een gepasteuriseerde overenting van 164, had na een gebruik van 33.5 L. H₂ nog geen methaan gevormd.

Toen het onderzoek zoover gevorderd was, kon met kans op succes getracht worden de reincultuur van de zuurvormende bacillen te verkrijgen. Vroegere pogingen daartoe moesten mislukken, omdat de cultuurvloeistof toen zelf nog niet steriel was. Deze steriliteit werd tenslotte verkregen met behulp van filterkaarsen. Door uitzaaien van de gepasteuriseerde ruwcultuur op

⁵⁾ Biochem Zeitschr. Bd. 245.

vaste voedingsbodems gelukte het zuivere kolonies op de plaat te krijgen. Zeer goed voldeed hier mout-agar, waaraan 10% steriel modderextract is toegevoegd. Echter ook op grond-agar met 10% modderextract en minerale zouten ontwikkelden zich kolonies van de zuurvormers. De platen werden in een exsiccator met waterstof bij 30° C. geplaatst. Ook werd een weinig H₂S in de exsiccator gebracht en ingeval op grondextract-agar werd gekweekt bovendien nog CO₂. Het was nu betrekkelijk eenvoudig reinculturen te krijgen. Door eenige overentingen werd dit bereikt. De koloniën van dezen bacil zijn vuilwit, tot bruinachtig, soms min of meer doorschijnend dikwijls gaafrandig, doch ook meermalen uitloopers vormend. Bij microscopisch onderzoek vindt men staven van zeer wisselende lengte met eindstandige spore (foto 3).

In reinculturen met goede actieve stammen geënt kan de omzetting met zeer groote snelheid verlopen. Zonder tusschentijdsche bijvulling werd meerdere malen een verbruik van meer dan 1400 cm³ H₂ per etmaal geconstateerd, d.w.z. dat de druk in het cultuurvat op ongeveer 1/15 atmosfeer was gedaald. Bij tusschentijdsche bijvulling was het waterstofverbruik nog belangrijk op te voeren.

Het totale gasgebruik zoowel als de snelheid loopt in de verschillende culturen sterk uiteen. Deels moet dit worden toegeschreven aan individuele verschillen tusschen de verschillende stammen, maar misschien ook aan de samenstelling der voedingsbodem, die men niet geheel in de hand heeft. Steeds stopt na langer of korter tijd het gasverbruik. In sommige gevallen wordt dit veroorzaakt doordat het koolzuur verbruikt is. Men kan dan door toedienen van CO₂ de cultuur weer op gang brengen. Dit was b.v. het geval bij No. 327 (zie graphiek IV).

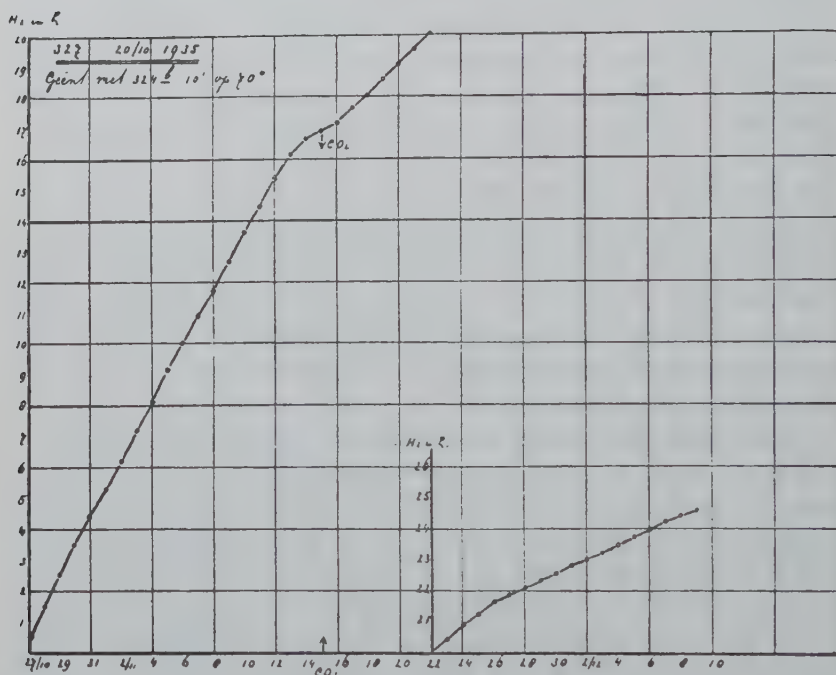
Nadat bijna 17 L. waterstof was geabsorbeerd, nam de snelheid af. Toen nu dagelijks CO₂ werd toegevoegd in de verhouding van 1 CO₂ op 2 H₂ nam de snelheid weer toe. Toch komt ook nu vroeger of later een eind aan de gasabsorbtie. De oorzaak hiervan is niet geheel duidelijk. In elk geval is het niet de acetaatconcentratie. Opzettelijk toegevoegd Na-acetaat in hoeveelheden, die hier in aanmerking komen, remden de H₂-absorbtie niet.

Enkele kolven, die veel gas hadden geabsorbeerd werden voor kwalitatieve en kwantitatieve analyse gebruikt. No. 281

verbruikte 40,590 L. H_2 . Bij destillatie van een deel der vloeistof werd 15,708 g azijnzuur verkregen, waarvan het Barium-zout gemaakt werd. 213.4 mg van dit zout bevatte 5,03 mg waterstof (theor. 5.01) en 40.1 mg koolstof (theor. 39.5).

No. 329 had 59.290 L. H_2 geabsorbeerd van 30° C. en een barometerstand van gemiddeld 76 cm. Het gewicht van deze hoeveelheid H_2 is ongeveer 4.6 g. Theoretisch levert dit 34.5 g

GRAFIEK IV.



azijnzuur. Bij destillatie van 1/5 deel der vloeistof werd gevonden 6.7056 g azijnzuur of totaal 33.258 g, een hoeveelheid, die zeer goed met het waterstofgebruik overeenstemt.

Met dit onderzoek is aangetoond, dat de vorming van methaan uit koolzuur en waterstof in twee fasen verloopt, die door verschillende microbensoorten worden tot stand gebracht. De eerste fase, de azijnzuurvorming, wordt volbracht door anaerobe sporenvormende bacteriën, die in reïncultuur werden verkregen. De tweede fase moet worden toegeschreven aan de organismen der eigenlijke methaangisting.

De vraag dient thans gesteld te worden, of er inderdaad wel microben bestaan, die uit koolzuur en waterstof direct methaan kunnen vormen.

Volgens de meening van Barker ⁶⁾ ontstaat het methaan steeds door reductie van koolzuur. Met zijn nog niet geheel zuivere culturen kon hij koolzuur kwantitatief tot methaan hydrogeneeren, waarbij aethyl- of buthylalcohol als waterstofdonator dienden en daarbij tot azijnzuur werden geoxydeerd. In de latere phase der gisting wordt weliswaar het azijnzuur waarschijnlijk door andere bacteriën weer omgezet tot methaan en koolzuur. Ook hier veronderstelt Barker, dat de hydrogenatie van het zuur vergezeld gaat van reductie van het koolzuur, ofschoon het bewijs hiervoor niet geleverd is. Proeven met de later door Barker ⁷⁾ verkregen reinculturen zijn noodig, om de vraag te beantwoorden of de methaan-vormende bacteriën in staat zijn koolzuur met gasvormige waterstof te hydrogeneeren.

⁶⁾ H. Albert Barker, Arch. f. Mikrobiologie Bd. 7, 404, 1936.

⁷⁾ Id. id. Bd. 7, 420, 1936.

Microbiologische moeilijkheden bij het kweken van groote hoeveelheden wortelknolletjes-bacteriën ¹⁾.

DOOR

G. HARMSSEN.

De drooggevalle gronden van den Wieringermeerpolder bevatten in de eerste jaren, tijdens het in cultuur brengen, slechts heel weinig wortelknolletjes-bacteriën, en ook nu nog is hun aantal veel te laag om een normale ontwikkeling van knolletjes op de wortels der Vlinderbloemige gewassen te verzekeren. Men is dus genoodzaakt deze organismen kunstmatig aan den grond toe te voegen, zoodra men tot den verbouw van Vlinderbloemigen overgaat. Reeds in de allereerste jaren na het droogvallen der gronden in 1931 en 1932 is n.l. gebleken dat door middel van een kunstmatige „enting” van den grond of juist gezegd van het zaad der Vlinderbloemigen een volkomen normale knolletjesvorming en ook een goede ontwikkeling van deze gewassen bereikt kan worden.

In deze mededeeling kan niet nader worden ingegaan op de natuurlijke verspreiding van de wortelknolletjes-organismen in de Wieringermeergronden, evenmin als op de uitvoering van de enting; voor nadere bijzonderheden hierover zij verwezen naar een voordracht, die schrijver dezes in 1935 gehouden heeft tijdens de Landbouwweek te Wageningen (verschenen in het Landbouwk. Tijdschr., 47e jaarg. No. 581) als ook naar een binnenkort verschijnende speciale mededeeling over de ervaringen betreffende de enting van Leguminosen in den Wieringermeerpolder. Hier, waar slechts enkele bacteriologische moeilijkheden, die zich bij het kweken van de entstof voorgedaan heb-

¹⁾ Voordracht gehouden in de vergadering van de Nederlandsche Vereniging voor Microbiologie op 23 Mei 1936.

ben, besproken zullen worden, moet volstaan worden met erop te wijzen, dat de in den Wieringermeerpolder jaarlijksch benooidigde hoeveelheden van de wortelknolletjes-bacteriën zeer groot zijn. In 1935 en ook dit jaar — de top-jaren wat betreft het enten der Vlinderbloemigen — werden n.l. niet minder dan pl.m. 700 kg bacteriënmassa afgeleverd. Daarbij komt nog, dat deze hoeveelheid niet regelmatig gedurende het geheele jaar vervaardigd kan worden, maar vrijwel geheel binnen de drie maanden Maart—Mei gereed moet zijn, daar niet de grond maar het zaad der Vlinderbloemigen vlak voor het uitzaaien geënt wordt.

Uit het bovenstaande volgt dus, dat de bereiding van zulke groote hoeveelheden bacteriënmassa speciale eischen moet stellen en men daarbij ook een speciale werkwijze moet volgen. En toch mocht in de Wieringermeer de kweek-techniek om economische redenen niet te zeer gespecialiseerd worden, daar de inrichting goedkoop moest zijn en binnen enkele jaren zonder te groote kosten moest kunnen worden afgeschreven. Men verwachtte n.l. van te voren, dat de enting in de Wieringermeer op groote schaal slechts gedurende de eerste jaren noodzakelijk zou zijn. Het laboratorium, waarin de vervaardiging ter hand genomen werd, kon dus niet fabriekmatig, eenigszins naar analogie van een gist-fabriek, ingericht worden, maar moest men alleen de gewone research laboratorium-inrichting zoo goed mogelijk aan de massale productie aanpassen.

Het spreekt van zelf, dat zulk een provisorische inrichting ettelijke moeilijkheden, zooals verhoogde infectiekansen, geringer rendement, enz. met zich meebracht, en ook dat men daarbij niet op de ervaring van anderen kon voortbouwen, doch grootendeels zelfstandig de techniek moest uitwerken en moest trachten ermede zoo veel mogelijk te bereiken.

Bij het zoeken naar de beste werkwijze kwam men al direct voor de beslissing te staan of het kweken in vloeibaar milieu of op een vasten voedingsbodem zou geschieden.

In de jaren 1932 en 1933 werden deze beide methoden dan ook nauwkeurig beproefd en met elkaar vergeleken. Al dadelijk maakte de vloeibare voedingsbodem daarbij een slechten indruk en ook na diverse wijzigingen en verbeteringen in de uitvoering (het roeren, aëreeren, en andere bijzonderheden) gelukte het niet de productiviteit ervan zoodanig op te voeren, dat hij met den vasten gelatineusen voedingsbodem kon concurreeren. Ten slotte

kwam er nog de eisch bij om het zaad bij het enten wel van de noodige hoeveelheid bacteriën te voorzien, maar toch zoo droog mogelijk te laten, waardoor men genoodzaakt werd de vloeibare cultures te filtreeren of te centrifugeeren (daar het bezinken te langzaam verloopt en nooit volledig is) hetgeen weer extra werk en tijd kostte. Hierdoor werd het kweken in vloeibaren voedingsbodem definitief verworpen en besloot men uitsluitend op een vasten agar-voedingsbodem te werken.

De volgende stap was het kiezen van de beste samenstelling van den voedingsbodem, dus van die samenstelling, waarbij het hoogste rendement verkregen kon worden. Deze kwestie is reeds uitvoerig bestudeerd en konden wij dus grootendeels van de ervaring van anderen profiteeren (32, 14, 15, 16, 20, 36, 37, 44, 45, 48, 53, 57, 58, 61, 62, 80), maar toch kwamen er meerdere speciale eischen bij, die de keuze moeilijk maakten. In de eerste plaats was het niet voldoende een groote hoeveelheid bacteriën te kweken, maar moesten dezen ook een groote resistentie bezitten tegen ongunstige uitwendige invloeden — voornamelijk tegen het uitdrogen, aangezien het zaad na het enten in luchtdrogen toestand bewaard moet kunnen worden. De wortelknolletjes-bacterie verdraagt het uitdrogen eigenlijk zeer slecht, zooals regel is bij de niet sporenvormende bacteriën (1, 26, 28, 32, 35, 38, 47, 64, 72, 75), maar toch kan een bepaald gedeelte van alle individuen in een cultuur veel langer in luchtdrogen toestand verkeerren zonder af te sterven, terwijl de groote massa der individuen reeds binnen enkele uren hun kiemkracht verliest. De afstervingskromme van *Rhizobium* bij het dragen vertoont dan ook een vrij scherpen knik, waar zij uit een stijl verloop overgaat in een juist zeer vlak gedeelte, op het oogenblik, waarop alléén de droogteresistente fractie nog in leven is gebleven. Het is hier niet de plaats in te gaan op de nog speculatieve verklaring van dit, overigens door meerdere onderzoekers (26, 28, 32, 38, 47) reeds waargenomen, verschijnsel, men kan echter vrij zeker aannemen, dat de droogteresistente individuen diegene zijn, welke in een bepaald stadium van hun ontwikkeling verkeerren.

Nu merkten wij al spoedig op, dat het percentage van deze individuen zeer sterk beïnvloed wordt door den voedingsbodem, althans in dien zin, dat het oogenblik van het maximale percentage droogteresistente individuen op verschillende tijdstippen van de totale ontwikkeling kan optreden. Wordt het heel vroeg

bereikt, wanneer nog slechts weinig kiemen per eenheid voedingsbodem ontwikkeld zijn, dan is het absolute aantal droogte-resistente individuen toch laag, al vormen zij ook een relatief hoog percentage van alle kiemen. En hetzelfde geldt ook voor de gevallen, wanneer zij pas heel laat talrijk gaan optreden, wanneer reeds vele kiemen weer afsterven. Over het algemeen wordt het vroege optreden van den droogteresistenten vorm begunstigd door een schralen semi-synthetischen voedingsbodem, voornamelijk door het weglaten van eiwit-achtige stoffen en toediening van de stikstof in anorganischen vorm. Deze eischen worden dus het meest benaderd door stikstofhoudende modificaties van den voedingsbodem van Ashby (6, 32), die wij dan ook in vele gevallen bezigen. De samenstelling is nader aangegeven op pag. 281). Bij meerdere *Rhizobium*-stammen is hierop echter slechts een geringe totaalopbrengst te bereiken en is de groei traag. Een organische stikstofbron is dan onmisbaar (32). Bovendien bleek de maximale ontwikkeling slechts mogelijk te zijn, als de voedingsbodem niet synthetisch was maar ook kleine hoeveelheden van niet nader te definieeren groeibevorderende stoffen (vitamine B?) bevatte (3, 4, 32, 66). Zodoende waren wij genoodzaakt gemakkelijk te vervaardigen en goedkope extracten van plantaardige of dierlijke producten in den voedingsbodem te verwerken. De beste resultaten werden daarbij verkregen met extract van pers-gist, wanneer het te doen was om stikstofrijke voedingsbodems en van wortelen voor de stikstofarme voedingsbodems. Vleeschwater was veel minder geschikt, daar hierop de kieming en eerste aanslag der wortelknolletjes-bacteriën zeer bemoeilijkt en vertraagd waren, zoodat de groei eerst zeer onregelmatig en pleksgewijze begon om pas later welig te worden. Hoewel de uiteindelijke maximale ontwikkeling op vleeschwater-voedingsbodem niet bij die op het gistwater bereide ten achter stond, was deze trage eerste ontwikkeling toch zeer nadeelig, daar de toevallige luchtinfecties in dien tijd vrij spel hadden.

De tweede speciale eisch, dien wij aan den voedingsbodem moesten stellen was dan ook, dat de ontwikkeling der wortelknolletjes-bacteriën daarop snel en massaal moest zijn, d.w.z. de geënte agar-platen moesten zoo vlug mogelijk door een gesloten laag van bacteriën-massa overgroeid worden om met de zeer hinderlijke en nadeelige — later nader te bespreken —

luchtinfecties direct al te kunnen concurreeren. Een snelle vorming van veel massa wordt echter naast een hoog tempo van celdeeling ook bevorderd door de vorming van veel slijm door de bacteriën, en hoewel slijm-arme cultures op zich zelf te verkiezen zouden zijn boven volumineuse slijmige, bleek een snelle slijm-rijke ontwikkeling met het oog op de onderdrukking der infecties toch de voorkeur te verdienen boven de trage droge. De vertragende invloed van het vleeschwater op de eerste ontwikkeling werd reeds genoemd. Daarnaast echter bleken het al of niet vormen van slijm en de snelheid van groei sterk beïnvloed te worden door het koolhydraat dat als energiebron in den voedingsbodem fungeerde. Uit de literatuur (8, 32) was ons reeds bekend, dat manniet algemeen als een zeer geschikte energiebron voor de wortelknolletjes-bacteriën wordt beschouwd, en onze eigen ervaringen konden deze zienswijze volkomen bevestigen. Het nadeel van manniet voor een massale productie is echter, dat ze nog al kostbaar is. Wij zochten dus naar een goedkoopere stof. De polyosen en van deze afgeleide stoffen kwamen daarvoor niet in aanmerking, daar zij door *Rhizobium* moeilijker opgenomen worden dan de monosen (8, 46, 58, 65). Zodoende bleef alleen de bij uitstek goedkope glucose als mogelijkheid over.

Helaas bleek glucose bij nader inzien toch bij manniet ten achter te staan juist in de begunstiging van de slijmvorming. Op den duur, dus na een incubatie van 10 á 14 dagen, was de productie op den glucose-voedingsbodem wel vrijwel gelijk aan die op den manniet-voedingsbodem, zoowel in het aantal levensvatbare individuen als ook in grammen bacteriën-massa. De slijmigheid der cultures was uiteindelijk dus ook gelijk. Maar het verloop van de ontwikkeling was geheel anders: de glucose begunstigt in het begin een snelle deeling maar laat slechts weinig slijmvorming toe, zoodat de cultures eerst schijnbaar traag groeien om pas in de tweede helft van het bebroeden natter en volumineuser te worden, terwijl men op den manniet-voedingsbodem juist het tegenovergestelde ziet — in het begin een zeer snelle en oogenschijnlijk welige ontwikkeling tot een zeer natte slijmrijke cultuur, die pas later door een voortgaande deeling der bacteriën, individuenrijker en relatief dus minder slijmig wordt. Enkele cijfers verkregen met een van witte klaver geïsoleerden stam (No. 12) van *R. trifolii* mogen het bovenstaanden illustreeren:

TABEL I.

Bepaald na incubatie gedurende:	1½ dag		3½ dag		7 dagen	
	manniet	glucose	manniet	glucose	manniet	glucose
Opbrengst bacteriën-massa in gr per agarplaat	7	3	12	7	15	15
Aantal levensvatbare kiemen per gr cultuur .	1.6×10^9	2.3×10^{10}	1×10^{10}	1.5×10^{10}	1.4×10^{10}	1.5×10^{10}
Totaal aantal levensvatbare kiemen per agarplaat (berekend uit de beide bovenst. regels) .	1.1×10^{10}	7.0×10^{10}	1.2×10^{11}	1.05×10^{11}	2.1×10^{11}	2.3×10^{11}

Toen zodoende dus duidelijk gebleken was, dat glucose bij de door ons gevolgde kweekwijze in Petri-cultuur-doozen de manniet niet geheel kan vervangen, gingen wij na of men misschien ook met een gedeeltelijke substitutie van manniet door glucose tot gunstige resultaten kan komen. Dat bleek inderdaad zeer goed mogelijk te zijn, want niet alleen de helft van de manniet, maar zelfs $\frac{3}{4}$ of nog meer kan men vrijwel straffeloos door glucose vervangen zonder dat de sterke slijmvorming en de daaruit resulterende spontane toename der massa in het begin van het bebroeden, verloren gaan. Reeds de aanwezigheid van een zeer geringe hoeveelheid manniet naast glucose veranderde de slijmarme en trage groei van *Rhizobium* in een snelle en slijmige, die slechts weinig ten achter stond bij dien op uitsluitend manniet bevattenden voedingsbodem. Zie tabel II (heeft betrekking op den zelfden stam No. 12):

TABEL II.

Opbrengst bacteriën-massa in gr. per agar-plaat	Uitsluitend manniet	$\frac{1}{2}$ manniet $\frac{1}{2}$ glucose	$\frac{1}{4}$ manniet $\frac{3}{4}$ glucose	Uitsluitend glucose
na 1½ dag	7	7	6.5	3
na 3½ dag	13	13	12	8
na 7 dagen	16	16	16	15

Zoodoende bleek het dus zeer goed mogelijk te zijn glucose als voornaamsten energiebron te gebruiken maar moest men daarnaast toch ook een zekere hoeveelheid manniet toevoegen, althans zoolang men vasthoudt aan den eisch van vlugge en massale ontwikkeling van de cultuur ter voorkoming van de uitbreiding der infecties.

Deze manniettoevoeging had ook nog een tweede betekenis, die de voedingsbodem aan den derden en laatsten specialen eisch moest laten voldoen: de zuurvorming door sommige stammen van wortelknolletjes-bacteriën werd hierdoor n.l. verminderd. Sommige stammen van *Rhizobium* vormen nooit zuur, onverschillig welke stoffen zij als voedingsbron ter beschikking hebben, maar andere stammen zijn wel in staat zure afbraakproducten te vormen en soms zelfs in zeer aanzienlijke hoeveelheid (5, 7, 8, 18, 19, 31, 32, 33, 58, 65, 68, 76, 77, 79, 80). Het meest geprononceerd is deze eigenschap bij *R. meliloti*, dus bij de stammen van Lucerne (*Med. sativa* L.), hopperupsklaver (*Med. lupulina* L.) en honingklaver (*Melilotus* sp.). En dat zijn juist de gewassen die in de Wieringermeer het meest verbouwd worden, en die de enting ook volstrekt niet kunnen missen. Bij gebruik van voedingsbodems, die uitsluitend manniet bevatten, merkt men niets van het vermogen tot zuurvorming, wel echter zoodra suikers als energiebron gebezigd worden (5, 8, 18, 19, 31, 32, 46, 65, 68, 76, 77, 80). En dan treedt door de zuurvorming al spoedig een belemmering van de verdere ontwikkeling op, daar *R. meliloti* juist tot de meest zuurgevoelige stammen behoort. De lucerne- en hopperups-stammen ontwikkelen zich op glucose voedingsbodems dan ook zeer slecht en bereiken ook na heel langdurige incubatie niet dezelfde ontwikkeling als op een manniet-voedingsbodem. Voor deze stammen is een zuivere glucose-voedingsbodem dus volstrekt onbruikbaar. Gelukkig bleek ook hierbij een vervanging van slechts $\frac{1}{4}$ van de glucose door manniet reeds een zeer sterken achteruitgang in de zuurvorming met zich mee te brengen, zoodat dan met een flinke dosis fijn verdeeld calciumcarbonaat in den voedingsbodem een opbrengst verkregen kon worden, die niet merkbaar bij die op zuiveren manniet-voedingsbodem ten achter stond. Het CaCO_3 werd echter tijdens de incubatie rondom de begroede gedeelte van de plaat grootendeels opgelost. (Fig. 1). De ten slotte door ons uitgewerkte voedingsbodems, die dus zooveel

mogelijk aan de bovenvermelde eischen beantwoorden, hebben de volgende samenstelling:

	0.05 gew. %	K_2HPO_4
	0.02 gew. %	$MgSO_4-7aq.$
	0.02 gew. %	$NaCl$
±	2.00 gew. %	$CaCO_3$
	1.15 gew. %	glucose
	0.35 gew. %	manniet
±	1.5 gew. %	agar
	90 gew. %	leidingwater
en 10	gew. %	extract van óf persgist, óf wortelen.

Uit het bovenstaande is gebleken, dat een van de voor-
naamste eischen, dien wij aan den voedingsbodem moesten stel-
len, was, dat de groei van de wortelknolletjes-bacteriën erop niet
alleen welig, maar ook zoo vlug mogelijk moest zijn om zoo-
doende de uitbreiding van de infecties zoo veel mogelijk te voor-
komen. Deze beduchtheid voor de lucht-infecties vindt zijn oor-
zaak in de door ons gevolgde werkwijze, waarbij de cultuur op
agar-platen in gewone platte Petri-cultuur-dozen gekweekt
wordt. Dit is juist het zwakke punt van onze techniek gebleken
te zijn. Een zeker percentage der agar-platen valt bij elk bacte-
riologisch werk wel aan luchtinfecties ten offer en in ons, in een
ruw onafgewerkt houten gebouw ondergebracht, laboratorium is
dit percentage eenigszins hooger dan bij de meeste andere insti-
tuten, maar toch was het nooit onrustbarend groot. Zoodoende
verwachtten wij — onervaren als wij waren in het massa-
kweken — in de jaren toen de bereiding van groote hoeveel-
heden entstof juist een begin nam, ook niet op catastrophale
moeilijkheden met de luchtinfecties te zullen stuiten en besloten
voor de vermeerdering der wortelknolletjes-bacteriën agar-
platen in de gewone Petri-cultuur-dozen te gebruiken. Pas toen
wij in 1934 reeds duizenden cultuur-dozen aangeschaft hadden
en op groote schaal aan het werk waren getogen, moesten wij
tot onze schade en schande ondervinden, dat de alledaagsche,
steeds sporadisch optredende, luchtinfecties zich tijdens de
kweekcampagne enorm uitbreidden, zoodanig dat reeds enkele
weken na het begin van het massa-werk vrijwel alle aangezette
agar-platen geïnfecteerd bleken te zijn.

In dat eerste jaar van massale entstof-productie (1934)

stonden wij in het begin radeloos tegenover deze moeilijkheid. Onze werkwijze, die in alles vlug en goedkoop moest zijn, was toen ook wel bij uitstek geschikt om zulk een overhand nemen der infecties mogelijk te maken: de juiste voedingsbodem was nog niet gevonden, het tijdelijke hulppersoneel was nog niet voldoende geïnstrueerd en ook niet voldoende doordrongen van het bewustzijn dat er zoo steriel mogelijk gewerkt moest worden, het oogsten van de rijpe cultuur geschiedde nog in het laboratorium zelf en nog ettelijke andere redenen voor de epidemische uitbreiding der infecties konden toen aangewezen worden. De kwaliteit van de vervaardigde cultuur en de productiviteit daalden toen ook bedenkelijk, en pas tegen het einde van de zaaiperiode, in Juni, was het ons, dank zij in koortsachtig tempo doorgevoerde wijzigingen, gelukt de infectie-epidemie het hoofd te bieden. De infecties waren wel niet volledig verdreven, maar wij hadden geleerd om niettegenstaande de aanwezigheid van de infectie-organismen toch een bruikbare entstof in vrij groote hoeveelheden te produceeren.

De voornaamste veranderingen, die wij tijdens die eerste kweekcampagne aanbrachten waren de volgende: In de eerste plaats brachten wij de eerste trap van de vermeerdering van de gemakkelijk infecteerbare Petri-cultuur-dozen over op met wattenproppen afgesloten platte cultuurkolfjes volgens Roux of Kolle (eenigszins door ons gewijzigd en meer aangepast aan massawerk), zoodat alleen de uiteindelijke laatste vermeerdering in Petri-schalen behoefde te geschieden. Oorspronkelijk werd de cultuur door ons vanuit de reïncultuur-buisjes direct op agar-platen in Petri-schalen uitgestreken en de hierop gegroeide cultuur weer benut om de groote hoeveelheid agar-platen ermede te bestrijken. Na het uitbreken van de epidemische infectie, echter, verkregen wij op deze wijze zoo goed als geen reine cultuur voor het beënten der groote massa platen; en het gebruik van reeds eenigszins geïnfecteerd entmateriaal was natuurlijk geheel te verwerpen, daar op de daarmee aangezette platen zoo goed als geen groei aan *Rhizobium* meer optrad.

Een tweede noodzakelijke wijziging was het verbannen van het oogsten der cultuur uit het laboratorium naar een afzonderlijk keetje. Bij het afstrijken der cultuur van de platen en bij het mengen en afwegen der bestelde hoeveelheden wordt er onvermijdelijk met de cultuur gemorst en aangezien de cultuur groo-

tendeels geïnfecteerd is met volatile bacillus- en schimmelsporen, bevordert dit morsen ten eerste de verspreiding der sporen. Deze infectiebron werd dus uit het laboratorium verwijderd en het met het oogsten belastte personeel werd het betreden van het laboratorium verboden. Omgekeerd mocht niemand van het overige personeel in het oogstkeetje komen.

Verder voerden wij verschillende rigoureuze ontsmettingsmaatregelen in, bestaande in het herhaaldelijk afnemen van alle tafels en andere voorwerpen met lysol of formaline, het dagelijks dweilen van de vloeren des ochtends vóór het begin van het werk met creoline, het bestuiven 's avonds na afloop van het werk van alle lokalen met creoline of formaline door middel van een flitspuit en dergelijken meer. Ook het personeel werd op de meest draconische wijze op steriel en zindelijk werken afgericht en werd elke 3 à 4 dagen van schoone laboratoriumjassen voorzien. Ten slotte moesten wegens het bij uitstek winderige klimaat van de Wieringermeer alle ramen door middel van speciaal band tochtvrij gemaakt worden om de lucht in de lokalen zoo min mogelijk in beroering te doen zijn tijdens het enten der platen.

Maar al deze maatregelen bleken nog niet voldoende te zijn om het gebouw volledig te zuiveren en bleef het grootste gedeelte der platen infecties vertoonen. Wij waren toen dan ook niet in staat werkelijk reine *Rhizobium*cultuur af te leveren en bevatte onze entstof steeds min of meer diverse vreemde organismen. Gelukkig bleek geen dezer bijmengsels antagonistisch of anderszins schadelijk te zijn voor de vorming der knolletjes, noch in den grond noch in de agar-buizen, waarin elk jaar de contrôle van de werking der diverse cultures uitgevoerd wordt. Het eenige nadeel, dat de infecties veroorzaakten was de concurrentie met, en de onderdrukking en overwoekering van de wortelknolletjes-bacterie op de platen. Ten slotte legden wij ons er bij neer, dat wij in 't groot geen ware reincultuur produceerden maar een geïnfecteerde, maar toch zeer goed werkzame entstof, die volkomen aan zijn doel beantwoordde. Deze berusting in de onzuiverheid der afgeleverde cultuur is des te meer gerechtvaardigd, daar het bleek, dat de graad van verontreiniging verminderd en de productiviteit der entstofbereiding ten eerste opgevoerd konden worden door de agar-platen in de Petri-schalen extra zwaar te enten. Wij gingen er n.l. toe over op elke

plaat niet één kleine euse *Rhizobium*-cultuur uit te strijken, maar 2 à 3 extra groote eusen, tezamen ongeveer 0.15 gr, waardoor de cultuur van den beginne af aan een voorsprong had op de infecties, zoodat dezen zich niet in die mate konden ontwikkelen als op dun geënte platen.

Door al de boven omschreven maatregelen, maar voornamelijk door het dikke enten der agar-platen bereikten wij ten slotte een zeer bevredigende productiviteit, en oogstten per plaat van 14 cm. diam. plm. 15 gr cultuur van de slijmig groeiende stammen (*Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* en dergel.) en plm. 8 gr van de drogere stammen (*R. meliloti*, *R. lupini*, *R. Japonicum*, enz.) hetgeen slechts weinig ten achter staat bij de gemiddelde opbrengst op geheel reine agar-platen (plm. 19, resp. plm. 10 gr). Tegen het einde van de zaaicampagne van 1934 hadden wij dus wel geleerd de epidemische infecties in toom te houden en konden wij met de door ons gekozen werkwijze wel aan de gestelde eischen voldoen, maar een algeheele uitroeiing der infecties was ons niet gelukt en de relatief gunstige resultaten waren ook alleen te bereiken ten koste van veel extra werk en onkosten, daar al de boven aangegeven ontsmettingen en steriliteitsmaatregelen nog al bewerkelijk zijn.

Toen rees dus de vraag of wij tegen de volgende zaaicampagne in het voorjaar van 1935 niet beter deden onze werkwijze in Petri-schalen geheel over boord te gooien en uitsluitend in de speciale breedhalzige Roux-kolfjes te kweken. In deze kolfjes bleek de infectie n.l. haast niet voor te komen, evenmin als in de reageerbuisen met schuin gestolden agar, waarin de collectie reïncultures aangehouden wordt. Tenslotte hebben wij van zulk een radicale verandering echter toch afgezien en wel in de eerste plaats om financieele redenen. Wij waren toen n.l. reeds in het bezit van ettelijke duizenden Petri-schalen, die dan overbodig zouden worden, terwijl wij dan nogmaals een zeer groote uitgaaf moesten doen voor het aanschaffen van evenveel duizenden Roux-kolfjes. En daar kwam nog bij, dat de door ons gebruikte Petri-schalen een in den handel verkrijgbaar courant model hadden, en dus relatief goedkoop waren, terwijl de Roux-kolfjes voor ons speciaal vervaardigd moesten worden, daar het gewone model met den smallen hals te groote moeilijkheden oplevert bij het afstrijken der cultuur. Bovendien zijn het gieten, het enten en het oogsten der Roux-kolfjes, ook van de speciale

breedhalzige, toch nog merkbaar bewerkelijker dan het bij Petri-schalen het geval is, zoodat hierdoor de besparing op de diverse steriliteitsmaatregelen gedeeltelijk toch weer te niet gedaan zou worden. Sommige dezer maatregelen konden trouwens toch niet vervallen zonder een infectie-epidemie ook in de Roux-kolfjes mogelijk te maken. En ten slotte hoopten en verwachtten wij toen ook, dat wij in 1935 een epidemische uitbreiding der infecties geheel zouden voorkomen, als wij maar van den beginne af aan al de genoemde voorzorgen zouden nemen. Deze verwachting is helaas niet in vervulling gegaan en steeg zoowel in 1935 als ook in 1936 reeds enkele weken na het begin der massa-werkzaamheden het percentage geïnfecteerde platen weer snel, zoodat ten slotte weer op vrijwel alle platen de diverse infectie-organismen aanwezig waren. Niettegenstaande al de voorzorgsmaatregelen verspreidden de infectie-kiemen zich toch door het geheele gebouw en was het ten slotte zelfs moeilijk agar-platen te gieten zonder dat zij daarbij al geïnfecteerd werden. Over 't algemeen en voor eventueele herhalingen in de toekomst (Noord-Oostelijke Inpoldering) moest uit het bovenstaande dus zeker geconcludeerd worden, dat het kweken in gewone Petri-schalen in onze omstandigheden zeer lastig is, en dat men verstandiger doet groote speciale breedhalzige Roux-kolfjes ervoor te gebruiken, voor de Wieringermeer was een verandering van werkwijze echter niet meer gerechtvaardigd. In de eerste plaats bereikte men op den bovenomschreven eenmaal ingeslagen weg, toch ook zeer behoorlijk het gestelde doel en bovendien stond het in 1935 reeds vast, dat daarná nog maar één keer in (1936) een zeer groote productie van *Rhizobium*-cultuur noodzakelijk zou zijn, maar dat daarmede ook vrijwel alle gronden in de Wieringermeer met elk der specifieke stammen geënt zouden zijn en verdere entingen dus overbodig zouden worden. Zodoende handhaafden wij de kweekwijze in gewone Petri-schalen en bleven dus ook steeds geïnfecteerde cultuur afleveren.

Alvorens van de bespreking der moeilijkheden, die wij van de vele infecties ondervinden, af te stappen is het misschien de moeite waard met een enkel woord bij de voornaamste infectie-organismen te blijven staan.

Het gevaarlijkst en het lastigst zijn de diverse aërobe sporenvormers, behorende tot de *Subtilis-Mesentericus*-

groep. In de eerste plaats zijn meerdere vertegenwoordigers ervan zoodanig ubiquistisch en algemeen, dat zij steeds en overal sporadisch voorkomen, zoodat men ze nooit blijvend uit het laboratorium kan weren, alle sterilisatie-pogingen ten spijt. Begint nu de periode van het massa-kweken, dan vormen die enkele gevallen van infectie den oorsprong van de epidemie. Het uitbreken van zulk een epidemie kan dan ook elk jaar bij het begin van het massa-kweken met absolute zekerheid voorspeld worden. Het is in onze omstandigheden zelfs nutteloos te trachten de massale uitbreiding te voorkomen. Principieel gemakkelijker te bestrijden zijn de zeldzame organismen, die men in gewonen doen eigenlijk nooit aantreft en die alleen toevallig ineens optreden. Zij kunnen zich dan tijdens het massa-werk gedurende het jaar van hun optreden wel massaal en even welig epidemisch uitbreiden en zijn dan soms even lastig te onderdrukken als de tevoren genoemde algemeene vormen, maar na afloop van het massa-werk kon men ze in den regel wel volledig uit het laboratorium verdrijven door ingrijpende ontsmettingsmaatregelen.

Onder de alom tegenwoordige alledaagsche sporenvormers kunnen wij drie duidelijk verschillende vormen onderscheiden: De eerste overtrekt de agar-platen met een vrij dikke mat-doffe laag, en is steeds gemakkelijk te herkennen aan een specifiëken zeer onaangename reuk. Door ons aangeduid als infectie I.

De tweede vormt een nat glimmende roomgele dikke laag op den agar en heeft een minder geprononceerde, maar scherpere geur. Door ons aangeduid als infectie II.

En de derde vorm overtrekt uiterst dun vaak nauwelijks zichtbaar, de agar en breidt zich in zeer lange onregelmatig vertakte uitloopers over het oppervlak uit. Ze is zoo goed als reuke-loos. Onze infectie III.

Van een nauwkeurige identificatie en determinatie van deze drie vormen moest wegens tijdgebrek afgezien worden, temeer daar het onderscheiden van de aërobe sporenvormers niet eenvoudig is en veel tijd vereischt. Het is ook niet urgent, daar deze algemeen bekende vormen zeer zeker reeds meermaals minutieus onderzocht en beschreven zullen zijn. Ter oriëntteering zijn hun voornaamste eigenschappen in tabel III vereenigt:

Laat men de speciale literatuur buiten beschouwing en baseert men zich uitsluitend op de determinatie volgens

Lehmann—Neumann (82) en Bergey (81) dan behoort onze infectie I vrij zeker tot *Bacillus subtilis* F. Cohn, terwijl de infecties II en III beiden tot *Bacillus mesentericus* (Flügge) L. et N. gerekend moeten worden, hoe verschillend zij ook mogen zijn. Toch behoort men deze determinatie met eenige reserve te aanvaarden, daar geen dezer organismen geheel en al in het schema volgens Lehmann—Neumann past, en sommige hunner eigenschappen in strijd zijn met de karakteristica der betreffende soorten. Zoo ziet men bijv. uit de onderstaande tabel duidelijk, dat onze *B. subtilis* groter en forscher is dan de *B. mesentericus* (Inf. II), terwijl het volgens het schema juist andersom had moeten zijn. De vrijwel volledige overeenstemming der overige kenmerken wettigt echter de door ons gekozen benamingen.

Het grootste gevaar van al deze drie organismen is gelegen in hun vermogen om op een vochtig agar-oppervlak zich zeer snel uit te breiden (te kruipen), zoodat vaak reeds binnen de 12 à 24 uur een geheele plaat overgroeid wordt. En vochtig wordt het oppervlak van de agar-platen altijd door het uitstrijken van de entstof, terwijl tijdgebrek nadrogen der geënte platen onmogelijk maakt.

Andere alledaagsche infectie-organismen hebben ons heel weinig last veroorzaakt. Zelfs de gewone schimmels — *Penicillium* en *Mucor* — traden nooit in hinderlijke hoeveelheden op. Wel echter werden wij reeds twee keer zwaar bezocht door minder algemeene — tijdens het gewone werk nooit waargenomen organismen. Een daarvan, waarmede wij juist dit jaar moesten vechten is ook weer een sporenvormende aërobe bacil, het meest overeenkomende met de *Bac. vulgatus* (Flügge) Migula van Lehmann—Neumann. Het zijn vrij groote bewegelijke, gram-positieve staven. 2.5 à 4.5 μ lang en \pm 0.7 μ dik, die vaak tot lange kettingen aaneen blijven hangen, zelfs wanneer zij reeds tot sporenvorming zijn overgegaan. De sporen zijn ovaal, vrijwel centraal gelegen \pm 1.5 \times 1.0 μ groot. De staven zwellen duidelijk op bij het sporuleeren. Gelatine wordt vervloeid. Op agar en op aardappel ontstaat eerst een vochtige en gladde groei, die pas na 3 à 4 dagen plaatselijk dof wordt en enkele dikke plooien gaat vertoonen. De kleur is grijswit. Vrijwel reukeloos. (Fig. 5.)

Dit organisme werd in April van dit jaar voor 't eerst waargenomen, maar heeft vermoedelijk reeds voor dien zijn intrede

TABEL III.

	Infectie I	Infectie II	Infectie III
Afmetingen der cellen op den gebruikten glucose-manniet-gistextract-voedingsbodem.	0.6 à 0.9 \times 1.5 à 3.0 μ	0.4 à 0.6 \times 0.8 à 1.8 μ	0.8 à 1.2 \times 2.0 à 7.0 μ (soms heel lange draden tot 20 μ zonder duidelijke septering)
Bewegelijkheid	Zeer bewegelijk	Bewegelijk	Wenig bewegelijk
Sporenvorming bij $\pm 26^\circ$ C.	Treedt reeds binnen ± 18 uur in	Treedt reeds binnen ± 12 uur in	Treedt pas na ± 48 uur in
Aard en aantal der sporen	Zeer talrijk, ovaal, bijna eindstandig, $\pm 1.5 \times 1.0 \mu$	Zeer talrijk, ovaal, bijna middenstandig, $\pm 1.0 \times 0.5 \mu$	Talrijk, ovaal, bijna middenstandig, $\pm 1.3 \times 1.0 \mu$
Opzwelling bij sporulatie	Duidelijk opgezwollen	Haast niet opgezwollen	Haast niet opgezwollen
Kettingvorming	Vormt lange kettingen	Vormt geen kettingen	Vormt geen kettingen, wel soms heel lange draden, zonder zichtbare insnoeringen.
Gelatinevervloeiing	Zeer sterk	Matig	Haast geen groei op, en ook haast geen vervloeiing van gelatine
Groei op aardappel	Zeer welig, het geheele oppervlak dof dik-rimpelig overtrekkend, grijswit van kleur	Welig, aanvankelijk nat glimmend, roomkleurig, later fijn rimpelig en gedeeltelijk dof	Trage groei, overigens als bij II, alleen nog fijner rimpeltjes en grijs-wit van kleur
Groei op droog agar-oppervlak (gistextract-glucose-manniet)	Groote, tot 4 cm ϕ , vlakke dof-wit-grijze kolon. met geschulpten en gerimpelden rand, vastzittend op de agar	Groote roomkleurige, vlakke, nat-glimmende kolon. met gegolfden rand, niet vastzittend op de agar	Heel zwakke groei als boomvormig verakte zeer vlakke witte, nat-glimmende kolon., niet vastzittend op de agar

gedaan doch bleef langen tijd onopgemerkt, doordat het zich in tegenstelling tot de *B. subtilis* en *B. mesentericus* niet kruipend over het agar-oppervlak verspreidt maar alleen homogeen vermengd met de *Rhizobium*-cultuur groeit. Pas op het laatst, bij oude platen, ziet men uit den rand van de *Rhizobium*-cultuur enkele hoekig vertakte uitlooptjes te voorschijn komen. Het leeft dus vermengd met de wortelknolletjes-bacterie zonder haar ernstig te schaden. Ent men echter zulk een mengcultuur over op een verse plaat, dan ontwikkelt zich de snelgroeïende *B. vulgatus* zoo vlug, dat hij reeds merkbaar over de *Rhizobium* gaat domineeren en de opbrengst en de kwaliteit der cultuur sterk vermindert.

Het andere speciale infectie-organisme, dat in 1935 zeer hinderlijk was en zeer veel extra werk heeft gekost, is een schimmel n.l. *Monilia sitophila* Mont. (= *Neurospora sitophila*) — de „Red bakers-mold” van Shear en Dodge (83, 84), die in de eerste dagen van de massaweek-campagne in 1935 toevallig in een Petri-schaal optrad en toen door onkunde niet met de noodige voorzichtigheid behandeld werd, zoodat hij zich daarna al spoedig epidemisch door het geheele laboratorium verspreidde en pas na afloop van het massa-werk uitgeroeïd kon worden. Dit jaar hebben wij hem slechts enkele keeren waargenomen en konden door krachtig ingrijpen een verdere verspreiding voorkomen. Een nadere beschrijving van dezen schimmel kan hier achterwege blijven, daar hij door Shear en Dodge (83) en Dodge (84) reeds zeer uitvoerig bestudeerd en beschreven is, en de door ons waargenomen schimmel volkomen met de beschrijvingen van Shear en Dodge overeenstemt¹⁾. Een enkele afb. (Fig. 6 en Fig. 7) geeft een indruk van den aard van het organisme. Zijn gevaar schuilt in de snelle ontwikkeling (overgroeiing van een plaat binnen 12 uur) en in de vorming van conidiëndragers langs den glaswand, vaak zelfs buiten tusschen bodem en deksel der Petri-schaal in, zoodat de gemakkelijke afvallende sporen bij de geringste aanraking van de schaal reeds stuiven. Alleen door het inwikkelen der schalen in papier zou het voortwoekeren eener *Monilia*-epidemie voorkomen kunnen worden. Maar ook dat moest wegens tijdgebrek bij het massa-werk achterwege blijven.

¹⁾ De determinatie van dezen schimmel werd verricht door het Centraalbureau voor Schimmelcultures, waarvoor aan deze instelling op deze plaats onze oprechte dank betuigd wordt.

Hiermede hebben de lastigste en werkelijk massaal optredende infectie-organismen de revue gepasseerd. Daarnaast traden nog enkele andere infecties vrij veelvuldig op en konden tijdelijk zelfs lastig worden, hardnekkig waren zij echter niet en kon men ze steeds door verscherpte contrôle weer uitroeien. De merkwaardigste van deze infecties was een melkzuurbacterie, die zich vrij welig op onze platen ontwikkelde en daarbij een karakteristieke geur naar zure melk („Molkig”) veroorzaakte. Zij produceerde vrij veel zuur, zoodat het krijt in de ermede geïnfecteerde platen volkomen opgelost werd en de groei van *Rhizobium* vroegtijdig tot stilstand kwam. In fig. 8 zijn deze melkzuurbacteriën afgebeeld; men ziet er de eigenaardige opzwellingen der staafjes die haar steeds kenmerkten.

Verder dient genoemd te worden een zeer groote bacil met afgeronde en iets puntige uiteinden, waarvan de individuen zich meestal paarsgewijze aan elkaar hechten. Hij vertoont een korriligen inhoud met duidelijke, zich gemakkelijk kleurende, poollichamen. De langwerpige sporen vormden zich pas laat en de staven vertoonden daarbij geen opzwellingen. Ook deze bacil vormde op onze platen iets zuur en was daardoor zeer hinderlijk, maar hij kwam alleen tot ontwikkeling bij aanwezigheid van een zekeren initiaal-zuurgraad ($\text{pH} = \pm 6.0$) zooals hij aanwezig is op een specialen later nader te bespreken zwak zuren voedingsbodem, waarop de *R. lupini* gekweekt wordt. Fig 9 geeft een beeld van dit organisme, waarbij meerdere sporen te zien zijn.

En ten slotte kan nog even genoemd worden een gist, die vrij vaak als infectie optrad en daarbij de *Rhizobium*-cultuur, waarmede hij gemengd groeide, melkwit maakte en een bros, scheurtjes vertoonend, vlies erop deed ontstaan, terwijl het onbegroeide deel van het agar-oppervlak er omheen met een interferentie-kleuren vertoonend vliesje overtrokken werd en ook wit troebel uitzag. Deze gist (zie fig. 10) hinderde de *Rhizobium*-cultuur betrekkelijk weinig mits hij niet te massaal erin voorkwam.

Geen van deze sporadische infectie-organismen zijn nader onderzocht. Wel staan reincultures ervan als ook van de gevaarlijke infecties ter beschikking van belangstellenden.

Boven werd met het oog op het onderdrukken der infecties reeds gewezen op de wenschelijkheid van snellen en massalen

groei der *Rhizobium*-cultuur, al was het dan ook alleen maar door de vorming van veel slijm tusschen de celletjes. Daar werd ook nagegaan op welken voedingsbodem de weligste en meest slijmige ontwikkeling bereikt kon worden. Nu bleken echter de verschillende stammen van *Rhizobium* in dezen zeer verschillend te zijn en sommigen konden op geen enkele wijze tot een slijmrijke groeiwijze gedwongen worden (25, 32, 51).

Het slijmrijkst en daarmee ook het vlugst-groeiend bleken te zijn de stammen van klaver, erwten en *Vicia*-boonen en van de *Phaseolus*-boonen (*R. trifolii*, *R. leguminosarum* en *R. phaseoli*), terwijl de voor den Wieringermeerpolder belangrijkste stam van lucerne en hopperupsklaver steeds veel trager en slijmarm groeit. Hoe groot de verschillen in dezen zijn volgt onmiddellijk uit onderstaande cijfers, die het aantal levensvatbare kiemen per gram bacteriën-massa van enkele stammen aangeven, allen gekweekt op denzelfden voedingsbodem en ook overigens in volkomen gelijke omstandigheden:

<i>R. leguminosarum</i>	(stam No. 3) — $\pm 7 \times 10^9$
<i>R. Trifolii</i>	(stam No. 12) — $\pm 1 \times 10^{10}$
<i>R. Meliloti</i>	(stam No. 15) — $\pm 1 \times 10^{11}$
<i>R. Lupini</i>	(stam No. 16) — $\pm 5 \times 10^{10}$

Reeds op 't oog kan men de slijmrijkheid eenigszins bepalen, doordat de cultuur witter en ondoorschijnender lijkt naarmate er meer individuen per gr aanwezig zijn.

Het kweeken van de slijmrijke klaver- en erwten- en boonenstammen bleek in onze omstandigheden dan ook onvergelijkkelijk veel gemakkelijker te zijn, dan dat van de drogere lucerne- en lupinestammen, terwijl ook de kwaliteit der cultuur in het eerste geval veel beter was dan in het laatste. Het behoeft dan ook niet extra vermeld te worden, dat wij alle mogelijke pogingen aanwendden om ook *R. Meliloti* en *R. Lupini* tot een snellere en slijmigere groeiwijze aan te zetten, en de boven aangegeven bijzonderheden van den voedingsbodem hadden ook hierbij inderdaad succes, maar toch bleven deze stammen relatief traag en slijmarm groeien.

Al spoedig bleek ons echter, dat niet alleen de diverse stammen doch ook de verschillende tot een stam behorende isolaties in diverse eigenschappen, o.a. ook in de groeiwijze, onderling zeer sterk kunnen verschillen. Onze eerste cultuur van *R. Meli-*

loti (No. 15) was niet door ons zelf geïsoleerd, maar ontvingen wij haar reeds in 1929 van Dr. M. P. Löhnis uit haar collectie, waarvoor haar hierbij onze oprechte dank betuigd wordt. Deze cultuur die Dr. Löhnis uit Wisconsin meegebracht heeft, en die dus reeds jarenlang op kunstmatige voedingsbodems in het laboratorium wordt voortgekweekt, groeit zeer traag en slijm-arm. Daarentegen bleken meerdere door ons later van lucerne of hopperupsklaver geïsoleerde cultures allen veel slijmrijker en weliger te groeien. In den beginne waren wij dan ook zeer ingenomen met onze isolaties en werd de Wisconsin-cultuur van het massagegebruik uitgesloten, nadat gebleken was, dat onze isolaties even virulent waren en evenveel stikstof bonden. Maar langzamerhand veranderde de groeiwijze van de nieuw geïsoleerde cultures en werden zij steeds droger, totdat zij binnen een jaar reeds niet meer van cultuur No. 15 te onderscheiden waren.

Deze verandering verliep zeer geleidelijk en wel bleek zij niet tijdelijk maar volkomen irreversibel te zijn. Bij dunne beënting der platen, waarbij er dus afzonderlijke koloniën op ontstonden, kon men heel duidelijk zien, dat de cultures die in de periode van groeiwijze-verandering verkeerden, twee volkomen verschillende typen van koloniën te zien gaven — kleine dofwitte en groote meer doorschijnende, terwijl de cultuur 15 uitsluitend kleine witte koloniën vormt. Eenigen tijd later, toen de versch geïsoleerde cultures al geheel tot de trage droge groeiwijze van cultuur 15 waren teruggelopen bleken zij bij hun uitzaaien ook zoo goed als geen groote doorschijnende koloniën meer te vormen.

De apart overgeënte kleine witte en groote doorschijnende koloniën bleken in deze eigenschappen gedurende een of twee overentingen constant te blijven, maar toch leverden de groote natte koloniën daarbij steeds een zeker percentage van kleine witte nakomelingen, terwijl uit de kleine witte koloniën nooit iets anders dan ook weer kleine witte ontstonden. Het was dus duidelijk, dat de uit wortelknolletjes geïsoleerde cultures aanvankelijk slijmrijk en welig groeiden maar op den duur op de kunstmatige voedingsbodems veranderen tot slijmarme traag groeiende vormen.

Door het uitkiezen van kleine witte koloniën uit een cultuur die beide vormen van koloniën vormt kan men dit van nature geleidelijke proces ineens ten einde voeren, maar het tegenover-

gestelde, dus het behouden van de slijmige groeiwijze door alleen van groote doorschijnende koloniën verder te kweken lukt niet; het degeneratieproces laat zich daardoor alleen vertragen maar niet geheel en al tegengaan, daar op den duur een steeds versterkte neiging om in de traag groeiende slijmarme vorm te „mutileeren” zich manifesteert.

Bij microscopische contrôle van de veranderde cultures bleek het, dat de drogere slijmarme groeivorm een degeneratievorm is, indien men het afwijken van de simpele en min of meer regelmatige staaf-vorm naar de grootere en onregelmatig gevormde „bacteroiden”-achtige vorm, als een degeneratie wil beschouwen. De vormveranderingen van *Rhizobium* en zijn daarmee in verband te brengen levenscyclus zijn reeds sinds lang een onderwerp van discussie en van diepgaane studie geweest, en toch zijn de ervaringen van de diverse onderzoekers hierbij nog zeer uiteenlopend en spreken zij elkaar vaak volkomen tegen (10, 14, 17, 32, 34, 39, 41, 45, 47, 50, 51, 52, 59, 70, 71, 74, 80). Zoo is ook de principiele vraag welke beteekenis men aan de echte „bacteroiden” in de wortelknolletjes en welke aan bacteroid-achtige vormen in reïncultuur in vitro moet toekennen niet opgelost (10, 32, 80). Wel staat het echter vast, dat in reïncultuur op kunstmatige voedingsbodems en ook in den grond steeds bacteroidachtige vormen optreden (9, 21, 58, 67, 69, 70, 71, 80), en dat de neiging tot hun vorming sterk beïnvloed wordt door den aard van den voedingsbodem en de heerschende zuurstofspanning (9, 11, 13, 17, 32, 58, 67, 71). Onze ervaringen stemmen met deze opvatting volkomen overeen, vooral de beteekenis van de onverminderde zuurstofspanning bleek groot te zijn: in vloeibare cultures en zelfs bij het cultiveeren op schuin gestolde agar in de reageerbuizen of op agar in de Roux-kolfjes degenereerden de cultures aanmerkelijk vlugger dan bij het kweken in gewone petri-culturen, en zelfs een dikke beënting der platen begunstigde reeds het ontstaan van de bacteroidachtige vormen. Daarentegen konden wij de gangbare of althans door zeer velen gehuldigde opvatting, als zouden deze bacteroidachtige vormen niet in staat zijn zich te vermeerderen (10, 12, 32, 49, 58, 80), niet bevestigen daar wij bij ééncel-cultures van zulke pseudo-bacteroiden steeds gemakkelijk aanslag en kolonie-vorming kregen, en ook bleken de gedegenereerde slijmarme cultures even goed knolletjes te vormen als de normale slijmrijke. De kleine witte

koloniën bestonden trouwens in alle stadia van hun ontwikkeling uitsluitend uit karakteristieke vergroote en onregelmatig gevormde bacteroidachtige individuen met talrijke sterk lichtbrekende korreltjes (coccus-form) ertusschen, maar bevatten nooit de normale staaf-vorm. Op de slanke afbeeldingen Fig. 11 en Fig. 12 ziet men den ongefixeerd en ongekleurd gefotografeerden Lucerne-stam (*R. Meliloti*), links in den normalen staaf-vorm uit een slijmig groeiende kolonie, en rechts in den bacteroidachtigen vorm uit een droge witte kolonie, beiden van dezelfde dun beënte plaat en van nog zeer jonge groeiende koloniën afkomstig. Op deze afbeeldingen zijn ook duidelijk te zien de karakteristieke lichtbrekende korreltjes, die vooral bij den bacteroidachtigen vorm vaak als het ware uit de pseudo-bacteroiden ontstaan door het uiteenvallen van de laatsten en dan vaak nog in groepen bijeen blijven in den vorm van de cel, die ze heeft opgeleverd. Op de beteekenis van deze korreltjes en in 't algemeen op de juiste verklaring van de geheele vormverandering bij de „degeneratie” kan hier niet worden ingegaan, daar ons de tijd ontbroken heeft dit bijzonder interessante maar tevens ook moeilijke onderwerp nader in studie te nemen. Voor ons zuiver practisch georiënteerde werk was het alleen van beteekenis dat *R. Meliloti*-cultures bij langdurig aanhouden op kunstmatige voedingsbodems zoodanig degenererden, dat zij veel trager en slijmarnier gingen groeien, en dat het ons niet is gelukt een voedingsbodem te vinden waarop deze degeneratie niet zou plaats hebben. Wij waren dan ook genoodzaakt van tijd tot tijd óf de oude cultures te verlaten en nieuwe te isoleeren, óf de gedegenererde cultures weer te verjongen door een passage over de hospes-plant. Eén zulk een passage ²⁾ was n.l. voldoende om de betreffende cultuur weer volkomen te regenereren.

Behalve de bovengeschetste moeilijkheden met het al of niet vormen van voldoende slijm, heeft dit slijm van *Rhizobium* ons ook nog op een geheel andere wijze gehinderd: de meeste stammen vormen n.l. vrij vloeibaar slijm dat een gemakkelijke en regelmatige verdeling der cultuur door het zaad toelaat, maar enkele stammen zijn gekarakteriseerd door veel visceuser

²⁾ In den regel worden zulke passages dan met behulp van uit steriel zaad in geheel steriele omstandigheden in agar gekweekte jonge lucerneplantjes uitgevoerd.

kleveriger slijm, dat soms zóó taai is, dat de koloniën van deze soorten in hun geheel van het agar-oppervlak afgelicht kunnen worden, als men ze aan een kant met een pincet vastpakt. Zulke cultures zijn, hoe goed ze overigens ook werken, in de practijk zeer lastig te hanteeren. Reeds het beënten der platen levert moeilijkheden op en nog lastiger is het zulke cultures regelmatig met zaad te mengen, want ook in water laten zij zich haast niet suspendeeren. Het eenige middel is dan de cultuur met water en scherp zand eerst vrij intensief tot een dun vloeibaar papje te schudden en dan het zaad met dit papje te vermengen. Maar na uitdrogen krijgt men dan bij het uitzaaien van dit zaad-zandmengsel veel last van ontmenging.

Gelukkig hadden wij in den Wieringermeerpolder niet veel met zulke taaie stammen te maken, daar het voornamelijk de *R. lupini* (de lupinen- en serradella-stam) en de *R. Janonicum* (de Soja-boonen-stam) zijn, die zulk taai slijm vormen; en geen van de hierbij behoorende gewassen heeft in de Wieringermeer een groote rol gespeeld. Maar toch moest een gebied van vier à vijfhonderd ha in het NO deel van den polder, waar ont kalkte, humeuse diluviale zanden in de bouwvoor voorkomen met lupinen voor groenbemesting bezaaid worden, zoodat hiervoor toch vrij groote hoeveelheden *R. Lupini* gekweekt moesten worden. Wij zochten dan ook naar middelen om deze cultuur minder taai te laten groeien.

Aanvankelijk baatte geen der aangewende middelen, zooals wijzigingen in de samenstelling van den voedingsbodem, kweken bij hoogere of lagere temperatuur, korter incubeeren en dus oogsten van nog jonge en gedeeltelijk onrijpe cultuur, enz. Ten slotte probeerden wij, geleid door de overweging, dat *R. Lupini* met planten met zwak zuur celsap symbiose vormt, hem op een zwak zuren voedingsbodem te kweken, inplaats van op den zwak alkalischen, die voor de meeste andere stammen de gunstigste was. Wij bereidden n.l. ongeveer denzelfden voedingsbodem als steeds, lieten echter het bufferende krijt weg, vervingen het secundaire kaliumphosphaat (K_2HPO_4) door het primaire (KH_2PO_4) en regelden verder door zwak zoutzuur en NaOH de pH op 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 en 5,0 af. Het resultaat van deze poging overtrof onze verwachtingen, want niet alleen bleek bij de hoogere zuurgraden, tusschen pH=6 en pH=5, het slijm inderdaad veel minder taai te worden, maar ook ontwikkelde zich de cul-

tuur nu aanzienlijk vlugger en weliger, zoodat veel hogere opbrengsten verkregen werden en de oorspronkelijk zeer lange incubatietijd van 3 weken tot 2 weken teruggebracht kon worden. Hiermede waren ineens de bijzondere ongemakken van *R. Lupini* overwonnen en konden wij deze cultuur verder even gemakkelijk bereiden als die van lucerne of klaver. De zwak zure voedingsbodem bood ook nog het voordeel van sterk verminderde vitaliteit der aërobe sporenvormer-infecties. Helaas kon de voor *R. Lupini* optimale zuurgraad van $\text{pH} = 5,5$ niet aangehouden worden, daar de agar bij dezen zuurgraad slecht stolt en de platen onhanteerbaar zijn. Wij moesten ons dus vergenoegen met een pH van 6 à 6,2, waarbij het slijm niet meer hinderlijk taai was en de opbrengsten ook al zeer bevredigend genoemd konden worden.

In het begin van dit betoog werd reeds vermeld, dat de hoeveelheid jaarlijksch benodigde *Rhizobium*-cultuur in den Wieringermeerpolder heel groot moest zijn en dat in 1935 en ook dit jaar weer ± 700 kg bacteriën-massa vervaardigd moest worden. Eenerzijds vindt zulk een enorm kwantum zijn verklaring in de uitgestrektheid van de Wieringermeer, waardoor jaarlijksch duizenden ha met Vlinderbloemige gewassen bezaaid moeten worden. Maar daarnaast moet hierbij niet vergeten worden, dat de door ons toegepaste dikte van enting zeer hoog is, vergeleken met de in den regel gegeven entvoorschriften³⁾. De ruimte verbiedt hier nader op de verklaring van de wensche-lijkheid eener extra dikke enting in te gaan (30, 42, 71, 73, 78), in 't kort moet echter vermeld worden, dat ten eerste de enting in den vrijwel *Rhizobium*-lozen Wieringermeerbodem uit den aard der zaak dikker moet zijn, dan in oude gronden, waar slechts van een zeker tekort aan den vereischten *Rhizobium*-stam gesproken kan worden, en ten tweede de wijze waarop de enting van het zaad en het zaaien hier uitgevoerd worden, zeer strenge eischen stelt aan het weerstandsvermogen der cultuur tegen het uitdrogen. Zooals in het begin reeds vermeld, is het slechts een speciale kleine fractie van alle levensvatbare individuen in een cultuur, die het uitdrogen behoorlijk verdraagt, terwijl het grootste deel der individuen den luchtdrogen toestand

³⁾ Wij gebruiken 6 gr cultuur per kg klaverzaad, dus $\pm 6.10^{10}$ bacteriën per $\pm 5.10^5$ zaadjes of ruim 10^5 bacteriën per zaadje.

op het zaad slechts enkele uren of hoogstens enkele dagen overleeft (26, 28, 38). Verhooging van het percentage dezer droogte-resistente vorm kan tot op zekere hoogte bereikt worden door een speciale samenstelling van den voedingsbodem, zooals reeds uiteengezet, maar nog meer zou gewonnen zijn, indien men middelen kon beramen om ook de overige individuen in leven te houden. Dan zou men de dikte der enting ineens zeer sterk kunnen reduceeren zonder de uitwerking te verminderen. Het is dan ook begrijpelijk, dat ettelijke pogingen door ons zijn aangewend om in deze richting iets te bereiken. Het is n.l. een bekend feit, dat de droogte-resistentie van *Rhizobium* o.a. sterk afhangt van het substraat, waarop de cultuur opdroogt. Volkomen onaantastbare oppervlakten, zooals glas, katoen, en ook de zaadhuid zijn zeer ongunstig, terwijl de met de hen omringende vloeibare phase in wisselwerking tredende stoffen — melkpoeder, zaagsel, turf, en vooral grond — in dezen veel gunstiger werken (1, 28, 30, 35, 47, 63, 64, 72, 75). Vooral in grond blijken de wortelknolletjes-bacteriën — zooals trouwens ook vrijwel alle microben — een bijzonder hoog weerstandsvermogen tegen diverse ongunstige invloeden te bezitten. Het leek dus niet hopeloos in deze richting iets te bereiken, als men maar trachtte de gunstige werking van den grond eenigszins te imiteeren. En toch zijn tot nu toe helaas al onze pogingen in deze richting volkomen mislukt. Eerst trachtten wij de hygroskopische werking van den grond, die nooit zoo droog wordt als de zaadschil, na te bootsen door diverse hygroscoopisch werkende stoffen aan de cultuur toe te voegen. Glucose, melasse, en nog meerdere andere onschadelijke hygroscoopisch werkzame stoffen werden geprobeerd; geen van allen echter werkte gunstig; sommigen waren zelfs gedecideerd schadelijk (te hooge osmotische waarden of directe vergiftiging). Daarna trachtten wij de specifieke eigenschappen van den grond als colloidaal systeem te benaderen door de cultuur te vermengen met diverse beschuttende colloïden. Gelatine, agar, colloidaal humuszuur (door zuren neergeslagen uit alkalische extracten van veen of hummushoudenden grond), kiezelgel, en ten slotte fijn verdeelde klei werden in dit verband aangewend. Maar ook deze pogingen hadden geen succes. Gelatine en agar werkten zelfs merkbaar schadelijk, terwijl hummuszuur — mits volkomen geneutraliseerd — en kiezelgel volkomen zonder invloed bleven. Alleen

het vermengen van de cultuur met fijn verdeelde klei scheen eenig nuttig effect te hebben. Toen voerden wij de hoeveelheid klei sterk op en verkregen zodoende een entstof, die grootendeels uit een dichte klei-suspensie bestond met daarin verdeelde *Rhizobium*-cultuur. Dit hielp inderdaad, vooral indien geen zuivere geprepareerde klei, doch natuurlijke neutrale zware kleigrond gebruikt werd (24), maar het volume van deze entstof werd zóó groot, dat het ermede bedeelde zaad langdurig omgescheept moest worden alvorens het voldoende opgedroogd was om weer in zakken vervoerd te kunnen worden en om gemakkelijk zaaibaar te zijn. Dat kostte weer veel extra tijd en werk en kon bij de in den Wieringermeerpolder gevolgde werkwijze dus niet toegepast worden. Zodoende is ook deze werkwijze, waarbij de wortelknolletjes-bacteriën dus eigenlijk niet meer op het zaad doch in de laag klei, die zich op elk zaadje afzette, opdroogden, en waarbij dus de bijzondere eigenschappen van den grond niet meer geïmiteerd werden, maar werkelijk direct grond toegevoegd werd, mislukt.

Een oogenblik dachten wij eraan de entstof heelemaal niet meer op het zaad te brengen, doch grond ermede te enten en dan óf deze grond met het zaad te vermengen, zooals elders vaak gedaan wordt, óf de geënte grond apart van te voren uit te zaaien. Maar ook deze plannen moesten opgegeven worden. Het vermengen van drogen grond met het zaad bracht het gevaar van ontmenging met zich mee bij het zaaien en de zaaimachines konden door het stof verstopt raken, terwijl het apart uitzaaien van geënte grond weer extra werk vereischte en daardoor te verwerpen was. Men moet hierbij n.l. niet vergeten, dat in de Wieringermeer alles volkomen commercieel beoordeeld moet worden en als men dan bedenkt, dat de bij de toegepaste dikke enting voor één ha vereischte entstof slechts f 1.25 kost, dan ziet men in, dat op 't veld practisch gesproken geen enkele extra verrichting mogelijk is zonder dat zij aanzienlijk meer gaat kosten dan de benoodigde entstof. Het zou dan ook een volkomen verkeerde zuinigheid zijn op entstof te sparen ten koste van veel duurdere speciale veld-maatregelen.

Ten slotte werd gepoogd de dikte van het enten te verminderen niet door een hooger percentage bacteriën het uitdrogen te doen doorstaan, maar door de cultuur vlak voor het gebruik te vermengen met de voornaamste voor de voeding van *Rhizobium*

vereischte stoffen n.l. met gistextract, waarin glucose opgelost was om zodoende de enkele op een zaadje overlevende individuen de mogelijkheid te geven zich na het uitzaaien van het zaad rondom het zaadje ten koste van deze voedingsstoffen te vermeerderen. Wij wilden de bacteriën op het zaad dus als het ware proviand medegeven. Het nuttig effect van dezen maatregel viel echter ook weer tegen. De gemakkelijk oplosbare glucose en het gistextract spoelden in den vochtigen grond heel gemakkelijk van de zaadjes en verspreidden zich snel door den grond, zoodat er geen sprake was van een gelocaliseerde ophooping van voedsel rondom de zaadjes. Iets betere resultaten werden dan ook bereikt toen de glucose vervangen werd door stijfsel, dat in den grond natuurlijk heel gemakkelijk ontleed wordt en dan dus geleidelijk ook de *Rhizobium* ten goede komt. Op deze wijze kon de enting inderdaad eenigszins en soms heel merkbaar dunner genomen worden zonder schadelijke gevolgen, maar helaas was het resultaat zeer wispelturig en hing zeer sterk af van den aard van den grond en van de weersomstandigheden na het zaaien. Men kon er dus nooit zeker van zijn, dat na toevoeging van zetmeel en gistwater met een lichtere enting zou kunnen worden volstaan. Ten slotte gaven wij deze pogingen op, ze leverden toch niet genoeg voordeel op, en hielden vast aan de oorspronkelijke dikte der enting.

Naast al de bovengenoemde methodische moeilijkheden, zou men nog ettelijke van de methodiek der bereiding onafhankelijke kunnen opnoemen, dus moeilijkheden, die het gevolg zijn van de specifieke eigenschappen van de wortelknolletjes-bacterie, en die zich dus bij elke andere werkwijze evenzeer zouden doen gevoelen. Het ligt echter buiten den opzet van deze mededeeling ook over deze problemen uit te weiden. Slechts één punt moet met een enkel woord aangeroerd worden, daar het eenerzijds van principieele beteekenis is, anderzijds echter in den regel niet voldoende gerealiseerd wordt, n.l. de verregaande specialiseering van de wortelknolletjes-bacteriën. Afgezien van het tegenwoordig algemeen erkende feit, dat er diverse stammen (soorten) van wortelknolletjes-bacteriën bestaan, waarvan elk slechts op bepaalde (meestal nauw verwante) Leguminosen werkzaam is, moeten deze stammen n.l. nog weer verder ontleed worden in vaak talrijke onderstammen of cultures, die nog weer nauwer gespecialiseerd zijn (2, 18, 19, 22, 23, 27, 32, 40, 43, 54, 55, 60).

Deze verdere specialisatie is weliswaar in den regel niet absoluut en zijn dus alle tot één stam behorende cultures wel min of meer werkzaam op alle tot de overeenkomstige groep behorende planten, maar toch treft men daarbij vaak een zoodanig sterk uitgesproken voorkeur voor één of slechts enkele vertegenwoordigers van de plantengroep aan, dat ermede terdege rekening gehouden moet worden, wil men van de best mogelijke uitwerking der enting verzekerd zijn. Het is dus niet voldoende over enkele stammen (= cross-inoculation-groups) te beschikken, maar moet men practisch gesproken voor elk te verbouwen gewas de best werkzame cultuur van den stam bezitten. Zodoende is men dus genoodzaakt in een geval als bij het in cultuur brengen van de Wieringermeer, waarbij vrij veel verschillende Vlinderbloemige gewassen verbouwd worden, van al die gewassen de meest virulente cultures te isoleeren en dezen dan ook in de collectie aan te houden. Tijdens het kweken en afleveren veroorzaakt deze veelheid van cultures een zekere onoverzichtelijkheid en vereischt speciale controle om verwarringen te voorkomen.

In het geval van de Wieringermeer heeft men te maken met de volgende stammen:

1. *R. leguminosarum* Frank — werkzaam op erwten (*Pisum sativum* L.) Lathyrus, tuinboonen (*Vicia Faba* L.) en Wikkens (*Vicia savita* L.)
2. *R. trifolii* Dangeard — werkzaam op witte klaver (*Trifolium repens* L.) Roode klaver (*T. pratense* L.) Zweedsche bastaardklaver (*T. hybridum* L.) Rolklaver (*T. minor* L.) Aardbeiklaver (*T. fragiferum* L.), enz.
3. *R. meliloti* Dangeard — werkzaam op lucerne (*Medicago sativa* L.) Hopperupsklaver (*M. lupulina* L.) en Honingklaversoorten (*Melilotus*).
4. *R. Phaseoli* Dangeard — werkzaam op stamboonen (*Phaseolus vulgaris* L.)
5. *R. lupini* Fred — werkzaam op Lupine-soorten (*Lupinus*), Serradella (*Ornithopus sativus* Brot.).
6. *R. Japonicum* Fred — werkzaam op Soja-boonen (*Glycine hispida* Maximw.).
7. *R. loti* Dangeard — werkzaam op Lotus-soorten.
8. *R. onobrychii* comb. nov. — werkzaam op Esparcette (*Onobrychis viciaefolia* Scop.).

Binnen sommige van deze groepen treft men slechts zwak uitgesproken specialisaties zooals bijv. in de klaver-groep, zoodat al de klavers vrijwel evengoed geënt kunnen worden met al de bij deze groep behorende cultures. Andere groepen daarentegen zijn zeer heterogeen en vindt men erbij soms cultures, die op één der bijbehorende planten zeer goed werkzaam zijn, en op een andere zoo goed als niet. De scherpste verschillen zijn wij tegengekomen in de Lotus-groep, waar de cultuur van *L. uliginosus* L. op *L. corniculatus* L. slechts bij uitzondering knolletjes doet ontstaan en omgekeerd. Maar ook in de voor ons bij uitstek belangrijke groep van *R. Meliloti* zijn de verschillen heel sprekend, en werkt de beste hopperupsklaver-cultuur op lucerne slecht en omgekeerd. In de eerste jaren, toen wij nog over weinig ervaring beschikten, en toen de diverse cultures door ons niet op al de bijbehorende platen beproefd waren, werd tegen deze specialiteit dan ook meermaals gezondigd en werden o.a. lucerne en hopperups met dezelfde cultuur beënt. In den loop van de jaren leerden wij echter de speciale verdeling kennen, en passen nu dan ook op elke plant de voor haar meest werkzame cultuur toe. De onbevredigende ent-uitkomsten, die wij in het begin soms hadden, niettegenstaande de enorme dikte der enting, komen nu en dan ook niet meer voor.

In den regel kan men de beste of althans zeer goed werkzame cultures gemakkelijk verkrijgen, door van elke plantensoort apart cultures te isoleeren en de zoo verkregen cultures dan ook alleen voor deze plantensoort te gebruiken; maar toch kwamen ook hierbij uitzonderingen voor, en het is ons een keer zelfs overkomen, dat wij van honingklaver een cultuur isoleerden, die op honingklaver wel vrij behoorlijk werkzaam was, maar haar beste vermogen toch op lucerne ontplooidde. Wil men den securen weg bewandelen, dan is het dus aan te raden van elke plantensoort meerdere isolaties te verrichten, daarbij het plantenmateriaal uit verschillende streken en van verschillende gronden betreffende, en dan de diverse cultures met elkaar te vergelijken en de beste eruit te kiezen. Uit den aard der zaak loopt het aantal isolaties en vergelijkings-cultuur-proeven daarbij erg op, zoodat daarin een groote hoeveelheid werk schuilt, temeer daar de hoedanigheid van een cultuur niet alleen naar de gemakkelijke van knolvorming en naar het aantal knolletjes beoordeeld mag worden, maar tevens naar de hoeveelheid

gebonden stikstof. Bij al de vergelijkingen moest men dan ook stikstof-bepalingen verrichten in de kleine in sterile N-vrije agar in reageerbuisjes groeiende kiemplanten. Meermaals werden daarbij bij verschillende op één plantensoort werkzame cultures verschillen in het stikstofbindingsvermogen gevonden van 50 % en meer terwijl de vorming van knolletjes vrijwel gelijk was.

In het bovenstaande zijn de voornaamste moeilijkheden, die bij de bereiding van entstof tijdens het in cultuur brengen van den Wieringermeerpolder ondervonden werden opgesomd. Sommigen daarvan konden vrij gemakkelijk overwonnen worden, andere echter zijn blijven bestaan en men moest langs een omweg trachten het gestelde doel toch te bereiken. De meeste van deze moeilijkheden zijn weliswaar geheel of althans voor het grootste gedeelte het gevolg van de speciale ruw-provisorische bereidingswijze, en zijn ze dus niet principieel, maar toch leek het ons niet geheel van belang ontbloomt een kort verslag erover uit te brengen. In de eerste plaats is het niet uitgesloten, dat ook in de toekomst ten onzent of in andere landen dergelijke groote ontginningen van saline gronden onder handen genomen zullen worden, en dat ook daar weer voor slechts enkele jaren een organisatie in het leven geroepen zal worden, die groote hoeveelheden *Rhizobium*-cultuur zal moeten kunnen produceeren; dan zal daarbij van onze ervaringen geprofiteerd kunnen worden. Bovendien zijn bij de hierboven aangegeven entstof-bereiding meerdere ook buiten het kader van de practische methodiek interessante verschijnselen waargenomen, waarvan het jammer zou zijn, indien zij niet op de een of andere wijze genotuleerd zouden worden. Dat zijn dan ook de redenen, die ons tot het in druk laten verschijnen van de bovenstaande mededeeling hebben bewogen.

LITERATUUR.

- (1) Alicante, M. M. *Soil Sci.* **21**: 27—52, 1926.
- (2) Allen, O. N., and Baldwin, I. L. *Wis. Agr. Expt. Sta., Research Bul.* **106**: 56 pp., 1931.
- (3) Allison, F. E. *Jour. Agr. Research (U.S.)*, **35**: 915—924, 1927.
- (4) Allison, F. E., and Hoover, S. R. *Soil Sci.* **41**: 333, 1936.
- (5) Anderson, J. A., Peterson, W. H., and Fred, E. B. *Soil Sci.*, **25**: 123—131, 1928.

- (6) Ashby, S. F. Jour. Agr. Sci. (England), **2**: 35—51, 1907.
- (7) Aso, K., und Murai, U. Conférence Internationale de Pédologie, Actes IV, Rome, 12—19 Mai, 1924, **3**: Sec. 2, 195—196, Rome 1926.
- (8) Baldwin, I. L., and Fred, E. B. Soil Sci., **24**: 217—230, 1927.
- (9) Barthel, C. Meddel. No. 198, Centralanst. Försöksv. Jordbruksområdet. Bakt. avdelningen No. 21, 14 pp., 1921.
- (10) Barthel, C. Ann. Inst. Pasteur, **35**: 634—647, 1921.
- (11) Barthel, C. Meddel. No. 308, Centralanst. Försöksv. Jordbruksområdet. Bakt. avdelningen No. 43, 16 pp., 1926.
- (12) Bazarewski, S. Roczn. Nauk Rolnicz., **17**: 1—34, 1927.
- (13) Bazarewski, S. Roczn. Nauk Rolnicz., **21**: 1—12, 1929.
- (14) Beijerinck, M. W. Bot. Ztg., **46**: 726—735, 741—750, 757—771, 781—790, 797—804, 1888.
- (15) Beijerinck, M. W. Bot. Ztg., **48**: 837—843, 1890.
- (16) Beijerinck, M. W. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. Sect. Sci., **21**: 183—192, 1918.
- (17) Bewley, W. F., and Hutchinson, H. B. Jour. Agr. Sci. (England), **10**: 144—162, 1920.
- (18) Bialosuknia, W. Roczn. Nauk Rolnicz., **10**: 142—147, 1923.
- (19) Bialosuknia, W. en Klott, C. Roczn. Nauk Rolnicz., **9**: 288—335, 1923.
- (20) Bréal, E. Ann. Agron. **14**: 481—495, 1888.
- (21) Buchanan, R. E. Ctbl. Bakt. (etc.) 2 Abt., **23**: 59—91, 1909.
- (22) Buhlert, H. Diss. Friedrichs Univ. Halle—Wittenberg, 1902.
- (23) Buhlert, H. Centbl. Bakt. (etc.) 2 Abt., **9**: 892—895, 1902.
- (24) Burlison, W. L., Sears, O. H., and Hackleman, J. C. Ill. Agr. Expt. Sta., Bul. **349**: 411—448, 1930.
- (25) Burrill, T. J., and Hansen, R. Ill. Agr. Expt. Sta., Bul. **202**: 115—181, 1917.
- (26) Chester, F. D., Del. Agr. Expt. Sta., Bul. **78**: 1—15, 1907.
- (27) Eckhardt, M. M., Baldwin, I. L., and Fred, E. B. Jour. Bact., **21**: 273—285, 1931.
- (28) Edwards, S. F., and Barlow, B. Ontario Agr. Col., Bul. **169**: 1—32, 1909.
- (29) Fellers, C. R. Soil Sci., **6**: 53—67, 1918.
- (30) Fellers, C. R. Soil Sci., **7**: 217—232, 1919.
- (31) Fred, E. B. Va. Agr. Expt. Sta., Ann. Rpt. 1911—12, 145—173, 1913.
- (32) Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, E. Madison, 1932.
- (33) Fred, E. B., and Davenport, A. Jour. Agr. Research (U.S.), **14**: 317—336, 1918.
- (34) Gibson, T. Jour. Agr. Sci. (England), **18**: 76—89, 1928.
- (35) Giltner, W., and Langworthy, H. V. Jour. Agr. Research (U.S.), **5**: 927—942, 1916.
- (36) Greig—Smith, R. Linn. Soc. N. S. Wales, Proc., **24**: 653—673, 1899.

- (37) Greig—Smith, R. Linn. Soc. N. S. Wales, Proc., **26**: 152—155, 1901.
- (38) Harding, H. A., and Prucha, M. J. N.Y. (Geneva) Agr. Expt. Sta., Bul. **270**: 345—362, 1905.
- (39) Hartleb, R. Chem. Ztg., **24**: 2.es Sem., 887—888, 1900.
- (40) Helz, G. E., Baldwin, I. L., and Fred, E. B. Jour. Agr. Research (U.S.), **35**: 1039—1055, 1927.
- (41) Hiltner, L. Forst. Naturw. Ztschr., **7**: 415—423, 1898.
- (42) Hiltner, L. Arb. K. Gsndhtsamt., Biol. Abt., **1**: 177—222, 1900.
- (43) Hiltner, L. Deut. Landw. Presse, **29**: 119—120, 1902.
- (44) Hiltner, L. Naturw. Ztschr. Land-u. Forstw., **2**: 127—159, 1904.
- (45) Hiltner, L., und Störmer, K. Arb. K. Gsndhtsamt., Biol. Abt., **3**: 151—307, 1903.
- (46) Joshi, N. V. India Dept. Agr. Mm., Bact. Ser., **1**: 247—276, 1920.
- (47) Káš, V. Věstník Českoslov. Akad. Zěmědělské, **3**: 584—588, 1927.
- (48) Laurent, E. Ann. Inst. Pasteur, **5**: 105—139, 1891.
- (49) Lewis, L. L., and Nicholson, J. F. Okla. Agr. Expt. Sta., Bul. **68**: 1—30, 1905.
- (50) Löhnis, F. Review of the literature, 1838—1918. Natl. Acad. Sci., **16**: 2d Mem., 335 pp., Washington 1921.
- (51) Löhnis, F., and Hansen, R. Jour. Agr. Research (U.S.), **20**: 543—556, 1921.
- (52) Löhnis, F., and Smith, N. R. Jour. Agr. Research (U.S.), **6**: 675—702, 1916.
- (53) Löhnis, M. P. Soil Sci. **29**: 37—57, 1930.
- (54) Löhnis, M. P. Ctbl. Bakt. (ect.), 2 Abt., **80**: 342—368, 1930.
- (55) Mann, A. R. (Director). Work and Exenditures of the Agr. Expt. Stas., 1917. U.S. Dept. Agr. Rpt. on Expt. Stas. and Expt. Work in U.S. 1917, Part 1, 193—198, 1918.
- (56) Manns, T. F., and Goheen, J. M. Del. Col. Agr. Expt. Sta., Bul. **115**: 1—40, 1916.
- (57) Mazé, M. Ann. Inst. Pasteur, **11**: 44—54, 1897.
- (58) Müller, A., und Stapp, C. Arb. Biol. Reichsanst. Land-u. Forstw., **14**: 455—554, 1925.
- (59) Neumann, P. Landw. Vers. Sta., **56**: 187—202, 1902.
- (60) Nobbe, F., Hiltner, L., und Schmid, E. Lanwd. Vers. Sta., **45**: 1—27, 1895.
- (61) Prazmowski, A. Landw. Vers. Sta., **37**: 161—238, 1890.
- (62) Prazmowski, A. Landw. Vers. Sta., **38**: 5—62, 1891.
- (63) Porges, N. Soil Sci. **32**: 6, 1931.
- (64) Rogers, L. A. Jour. Infect. Diseases, **14**: 100—123, 1914.
- (65) Schönberg, L. Centbl. Bakt. (ect.) 2 Ab., **79**: 205—221, 1929.
- (66) Slanetz, E. J. Proc. Conn. Branch, Soc. Amer. Bact., Abs. Bact. **7**: 352, 1923.

- (67) Sniesko, S. Bull. Acad. Polon. Sci. et Let. Cl. Sci. Math. et Nat. Sér. B: Sci. Nat. (Bot.) 55—74, 1928.
 - (68) Stevens, J. W. Soil Sci., 20: 45—66, 1925.
 - (69) Stutzer, A. Mitt. Landw. Inst. Breslau, 1: Heft 3, 63—71, 1900.
 - (70) Stutzer, A. Centbl. Bakt. (etc.), 2 Abt., 7: 897—912, 1901.
 - (71) Süchting, H. Centbl. Bakt. (etc.), 2 Abt., 11: 377—388, 417—441 en 496—520, 1904.
 - (72) Temple, J. C. Ga. Agr. Expt. Sta., Bul. 120: 65—80, 1916.
 - (73) Thornton, H. G. Jour. Agr. Sci. (England), 19: 373—381, 1929.
 - (74) Thornton, H. G., and Gangulee, N. Roy. Soc. (London) Proc., Ser. B., 99: 427—451, 1926.
 - (75) Vandecaveye, S. C. Soil Sci., 23: 355—362, 1927.
 - (76) Walker, R. H. Iowa Agr. Col. Expt. Sta., Research Bul. 113: 371—406, 1928.
 - (77) Walker, R. H., and Brown, P. E. Soil Sci., 30: 219—229, 1930.
 - (78) Wilson, J. K. Jour. Amer. Soc. Agron., 18: 911—919, 1926.
 - (79) Wright, W. H. Soil Sci., 20: 95—129, 1925.
 - (80) Zipfel, H. Centbl. Bakt. (etc.), 2 Abt., 32: 97—137, 1911.
 - (81) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Third Edit., 1930.
 - (82) Lehmann, K. B., und Neumann, R. O. Bakteriologie. Insbesondere bakteriologische Diagnostik. Siebente Aufl., 1927.
 - (83) Shear, C. L., and Dodge, B. O. Journ. Agr. Res. 34: 1019, 1927.
 - (84) Dodge, B. O. Journ. Agr. Res. 36: 1, 1928.
-

De huidige stand van het probleem der zoo- genaamde septische „influenza”-meningitis ¹⁾

DOOR

J. MULDER
(Arts, assistent).

Inleiding.

Het is hier niet de plaats in te gaan op de bacteriologische geschiedenis en de vroegere strijdvrage omtrent de haemoglobino-phiele bacteriën, welke bij gevallen van etterige meningitis met septicaemie, die zich voornamelijk bij zeer jonge kinderen voordoen, gevonden worden.

Zooals bekend, is Cohen (1) in 1909 de eerste geweest, die dergelijke haemoglobino-phiele bacteriën beschouwde als behorende tot een aparte groep, op grond van het feit, dat konijnen, na intra-veneuze injectie met reïncultures, stierven met een sterke bacteriaemie, iets wat met bacteriën van het type Pfeiffer niet gelukt was. Vooral in Amerika is de studie van deze meningitisstammen voortgezet (Wollstein 1911 (2), Rivers en Kohn 1921 (3), Neal, Jackson en Appelbaum 1934 (4). In Holland heeft Kapsenberg (5) een belangrijke studie over deze micro-organismen medegedeeld. Ook hij beschouwde dit type bacteriën als een ander dan de gewone bacteriën van Pfeiffer.

Het werk van Margaret Pittman (6) uit het Rockefeller-Instituut heeft op het vraagstuk der bacteriologie van deze meningitisstammen een nieuw licht geworpen. Het is in staat de vele tegenstrijdigheden in de literatuur over deze stammen te verklaren.

Pittman deelde mede (1931 en 1933), dat „influenza”-

¹⁾ Voordracht gehouden in de vergadering v. d. Nederl. Ver. voor Microbiologie op 14 Nov. 1936.

bacteriën op twee wijzen kunnen groeien, namelijk in smooth (S) en rough (R) cultures. De S-stammen vormen kolonies, welke „iridiseeren” bij schuin doorvallend kunstlicht en zonlicht (op doorzichtige Levinthalagar), zijn gekapseld en vormen een oplosbaar specifiek koolhydraat, aantoonbaar, evenals bij de pneumococcen, door een praecipitatiereactie met een immuun-serum. De S-cultures kunnen in vitro-overgaan in R-cultures, die niet iridiseeren, geen gekapselde individuen bevatten en geen specifiek koolhydraat vormen. De S-stammen zijn virulent voor muizen en konijnen, de R-stammen niet of minder. Met de praecipitatiereactie met immuunsera kan men meerdere typen onderscheiden. Van 41 meningitisstammen vormden 37 S-kolonies en behoorden tot één type (b). S-stammen werden echter ook gevonden in sputa, in een thorax-empyeem en in het bloed van lijders aan pneumonie (de aetiologie dezer pneumonieën en de leeftijd der lijders staat niet vermeld). Een anti-serum tegen type b-organismen heeft bij konijnen therapeutische werking. De ervaring over de behandeling met dit serum van kinderen met meningitis zijn bemoedigend.

De cultureele eigenschappen der meningitisstammen.

Onze eigen onderzoekingen over de meningitisstammen begonnen in het jaar 1932. Jarenlang onderzoek over het voorkomen van de bacterie(groep) van Pfeiffer in de Tropen (7) en in Holland bij acute en chronische bronchitiden en broncho-bronchiolitiden ging vooraf.

Het uiterlijk van de kweek van de eerste door ons onderzochte meningitisstammen op doorzichtige Levinthalagar scheen ons sterk afwijkend van wat we jarenlang beschouwd hadden als het normale voorkomen van cultures van bacteriën van Pfeiffer uit sputum.

De groei op Levinthalagar is zeer sterk en reeds na 12 uur heeft zich een dik beslag gevormd. Afzonderlijke kolonies hebben een bol oppervlak. In de eerste 8—24 uur van een kweek toonen zoowel afzonderlijke kolonies, als een cultuuroppervlak op de doorschijnende Levinthalagar bij schuin doorvallend kunst- of zonlicht een sterke schifting van het witte licht in de spectrumkleuren (een fotografie in kleurendruk hiervan bevindt zich in het Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde 1935, blz. 4447). Hoe schuiner het licht invalt, des te meer is de kleur naar rood

verschoven. Zelfs de kleinste kolonies toonen het verschijnsel. Na 48 uur is de lichtschifting onduidelijk geworden en verdwijnt later geheel. Dan zijn de cultures niet met zekerheid te onderscheiden van die van sommige sputumstammen. Men mag pas tot het bestaan van deze lichtschifting besluiten, als men de cultuur van blauw tot roze-rood ziet „oplichten”. Sputumstammen van het type Pfeiffer hebben slechts een grijs-blauwe tint bij schuindoervallend kunst- of zonlicht, ook in zeer jonge cultures van twaalf uur ouderdom.

De overige cultuureigenschappen der meningitisstammen kwamen overeen met die der sputumstammen. De bacteriën waren onbeweeglijk, groeiden slechts bij aanwezigheid van X- en V-factor (nagegaan bij 7 stammen) en vormden alle indol. Op bloedagar groei in fijne puntvormige kolonies zonder haemolyse. In microscopische praeparaten waren ze duidelijk dikker dan sputumstammen en toonden, vooral in de eerste cultures, sterke polymorphie.

In natte collargol-paerparaten (15 %) zag men het beeld van een gekapselde bacterie. Met kapselkleuringen verkregen we geen overtuigende kapselbeelden, in tegenstelling met Pittman. Met homolog type-specifiek immuunserum verkregen we geen beelden, die op de kapselzwellung van pneumococcen (volgens Neufeld) geleken. Verder onderzoek over dit thema is gewenscht, doch we achten het wel waarschijnlijk, dat deze microörganismen een kapsel bezitten, zij het dan ook misschien een slijmkapsel.

Pijper (8) heeft als eerste de diffractie van licht in cultures van bacteriën nauwkeurig geanalyseerd en vond, dat de dikte der bacteriën met het verschijnsel te maken heeft. Uit de grootte der, met een bepaalde techniek ontworpen, buigingsspectra der kolonies, berekende hij de middellijn van coccen en bacteriën en kwam hij tot de voorstelling, dat bacteriën in de kolonies loodrecht op het oppervlak der kolonie staan. Pijper schreef ons, dat vermoedelijk de sputumstammen te dun zijn om goede buigingsspectra te geven. Waarom het verschijnsel na 24 uur onduidelijk wordt, weten we niet. Men ziet dit meer bij lichtbuigende kolonies (o.a. van Pasteurellae).

De S-R-dissociatie der lichtbuigende meningitisstammen.

Nadat we bekend waren geworden met Pittman's onder-

zoek hebben we het gedrag van drie van onze stammen nagegaan. Zij behoorden allen tot subtype b van Pittman. Twee er van stamden uit etterig sputum (de stammen L en P, zie onder). Drie maanden na de isolatie toonden de drie stammen ongeveer tegelijkertijd kolonies, die geen lichtdiffractie meer vertoonden en bij verder afenten volkomen „dof” bleken te groeien, zoodat ze niet te onderscheiden waren van gewone sputumstammen. Hun andere eigenschappen kwamen echter volkomen overeen met die der lichtbuigende stammen en ze groeiden eveneens slechts bij de aanwezigheid van X- en V-factor in den voedingsbodem. Kruisagglutinaties (bij 56°) bewezen, dat de lichtschiftende en bijbehorende doffe stammen, wat hun antigene structuur ten opzichte van agglutinines betrof identiek genoemd mochten worden, zoodat we zeker waren geen mengsels van verschillende haemoglobino-phiele bacteriën te hebben geïsoleerd. We noemen met Pittman de lichtbuigende bacteriën S-vormen en de dof-groeiende R-vormen.

Om de S-cultures te behouden is dagelijks overenten noodzakelijk. Op bloedagar en in cultures met homolog antiserum verkrijgt men vrij gemakkelijk R-stammen (Pittman), doch niet altijd (eigen observaties).

In collargolpreparaten zijn de individuen der S-stammen duidelijk dikker dan die der R-stammen. Waarschijnlijk berust dit op verlies der kapselsubstantie. Deze geringere dikte is waarschijnlijk de oorzaak van het verlies van de sterke lichtdiffractie der kolonies.

R-stammen kan men evenzo goed als S-stammen emulgeeren in 0.2 % zoutwateroplossing. Ze zijn daarom geschikt voor agglutinatieproeven in de warmte.

Pathogeniteit voor konijnen der S- en R-stammen.

De S-vormen waren maandenlang na hun isolatie virulent voor konijnen bij intra-veneuze inspuiting. Deze konijnen-virulentie is een groot strijdpunt in de literatuur geweest. Ook naar onze eigen ervaring kan er echter niet de minste twijfel bestaan aan het feit, dat de S-stammen (suptype b) na intra-veneuze injectie konijnen kunnen dooden met een sterke bacteriëmie. De dosis daarvoor noodig is gewoonlijk groot (een halve tot heele agarbuis) en niet altijd sterft het konijn na de

eerste inspuiting. Altijd blijven de bacteriën langen tijd levend in de bloedbaan aanwezig (van 19—42 uur). Passagestammen worden virulenter en we hebben wel een konijn (600 gram) kunnen doden met bacteriaemie met één öse van een passage-cultuur.

Ter contrôle verrichten we een reeks entingen bij konijnen met 4 versch geïsoleerde sputumstammen van het type Pfeiffer (9). Een dezer stammen werd door 11 muizen en 19 konijnen gepasseerd door middel van intra-peritoneale inspuiting van groote doses. De meeste dieren overleden aan etterige peritonitis met een matig sterke bacteriaemie. Passagestammen waren echter nooit in staat na intra-veneuze injectie een dier te doden met bacteriaemie en 5 uur na de intra-veneuze inspuiting was het bloed meestal weer steriel. Soms stierven dieren op deze wijze geënt, zonder dat bacteriën uit het hartebloed terug te kweeken waren. Waarschijnlijk is daarbij een endotoxine van betekenis.

De R-varianten der S-stammen waren evenmin virulent voor konijnen bij intra-veneuze inspuiting. Tabel I geeft het verschil duidelijk weer. De S- en R-stammen waren bij het verrichten van deze proeven even oud.

Waarschijnlijk verklaart dit feit de vele mislukkingen van vroegere schrijvers om de meningitis-stammen bij konijnen virulent te maken. Menig onderzoeker zal onwetend zijn proeven verricht hebben met de avirulente R-stammen.

De serologische subtypen van Pittman.

Met specifiek praecipiteerende sera had Pittman in 1935 reeds 6 subtypen in deze groep van haemoglobinoïde bacteriën gevonden, welke zij aanduidde met de letters a, b, c, d, e en f¹⁾. Voor de uitvoering dezer praecipitatie verwijzen wij naar haar publicatie.

Bij de bereiding van type-specifieke antisera gingen we als volgt te werk: intra-veneuze injecties om de 4 dagen van hoogstens 15 uur oude cultures gedood in 0.4 % formaline (in physiologische zoutoplossing) en gesuspendeerd in physiologische zoutsolutie. Stijgende doseering van den inhoud van

¹⁾ In haar publicatie vermeldt Pittman slechts 2 subtypen a en b. Ze schreef ons echter, dat zij reeds meerdere subtypen had gevonden.

TABEL I.

Stam ¹⁾	Doseering	Bloedcultuur na:	
C ₃ (S) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: ++ S	
C ₃ (S) (I) .	1 agarbuiscultuur	5 uur: ++ S	19 uur: + S
C ₃ (S) (II) .	1 agarbuiscultuur	12 uur: + S	36 uur † ²⁾ : zwak + S
C ₃ (S) (III) .	1 agarbuiscultuur	12 uur: neg.	
C ₃ (S) (III) .	2 agarbuiscultures	4 uur: ++ S	15 uur †: +++ S
C ₃ (R) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: ++ R	
C ₃ (R) (I) .	2 agarbuiscultures	5 uur: ZW + R	19 uur † neg.
C ₃ (R) (II) .	2½ agarbuiscultures	5 uur: + R	19 uur † neg.
L (S) . . .	1 agarbuiscultuur	3 uur †: ++ S	
L (S) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: ++ S	17 uur †: ++ S
L (R) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: neg.	
L (R) (I) .	2 agarbuiscultures	4 uur: ++ R	17 uur: neg.
L (R) (II) .	2 agarbuiscultures	5 uur †: neg.	
P (S) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: ++ S	
P (S) (I) . .	1 agarbuiscultuur	3½ uur: ++ S	17 uur: ++ S
P (S) (II) .	1 agarbuiscultuur	4 uur: ++ S	17 uur †: ++ S
P (R) . . .	1 agarbuiscultuur	5 uur: neg.	
P (R) (I) . .	2 agarbuiscultures	5 uur: + R	19 uur †: neg.
P (R) (II) .	2 agarbuiscultures		19 uur †: zwak + R (1 kolonie in 2 buisjes)

¹⁾ De Romeinsche cijfers duiden passagestammen aan. S = Smooth; R = Rough.

²⁾ † = overleden.

De stam C₃ werd uit meningitisetser geïsoleerd; de stammen L en P uit sputum.

2—4—10—10 cultuurbuizen. Daarna levende, hoogstens 15 uur oude cultures om de 4 dagen; doseering één buiscultuur per keer. De stam was een 3 jaar oude meningitisstam, die dagelijks werd overgeënt en steeds uitsluitend S-kolonies vormde. Pittman volgt een andere werkwijze, doch stelt als eisch, dat de bacteriën op konijnenbloed moeten voortgekweekt worden. Hieraan konden wij door de omstandigheden niet voldoen.

Sneldiagnose van het subtype door middel van agglutinatie op het objectglas in de koude.

Ons eigen bereide praecipiteerende anti-S-serum, zoowel als dat van Pittman bleek nog een andere eigenschap te hebben,

welke voor een sneldiagnose van de betreffende bacterie zoo-
wel als van het subtype van groot belang is.

Evenzoo als de agglutineerende pneumococcen-konijnen-sera gaf het type specifieke serum van subtype b tot in een verdunning van 1 op 20 een sterke agglutinatatie van een homologe bacterieëmulsie in de koude. Het is noodig, dat men voor deze proef zeer jonge cultures gebruikt van hoogstens 24 uur ouderdom en die kolonies uitzoekt, die een sterke lichtdiffractie vertoonen, bij doorvallend kunstlicht. Deze agglutinatatie is onmiskenbaar: de bacterieëmulsie valt uiteen in enkele grove vlokken, die onmogelijk opnieuw tot een emulsie kunnen worden fijn gewreven. Wij doen deze proef, evenals bij de type-diagnostiek de pneumococcen op een objectglas met één öse onverdund antiserum. Het serumverbruik is zodoende minimaal groot. Contrôle met een stam van een ander, nog onbenoemd subtype, was negatief, evenzoo die met sputumstammen van het type Pfeiffer.

R-varianten van subtype b geven evenmin deze agglutinatatie in de koude te zien. We vonden, dat immuunsera, die geen praecipiteerende eigenschappen hadden, evenmin in staat waren onverdund in de koude agglutinatatie te geven, doch we namen ook waar, dat een voortgezette immunisatie van een konijn een serum leverde, dat uitsluitend kon praecipiteeren doch de agglutineerende eigenschap in de koude totaal mistte.

Hoewel voortgezet onderzoek over de voorwaarden voor het ontstaan van deze agglutinatatie in de koude dus noodig is, nemen we op het oogenblik aan, dat zonder type-specifieke praecipiteerende eigenschappen van een immuunserum en zonder de aanwezigheid van type-specifiek koolhydraat in de cultures geen agglutinatatie in de koude met niet of weinig verdund antiserum kan optreden en dat deze agglutinatatie dus evenzoo streng type-specifiek is.

Men kan deze agglutinatatieproef uitstekend gebruiken als sneldiagnosticum. Meerdere malen konden we op deze wijze de diagnose van het subtype b stellen 8 uur na het overenten van een naar ons toegezonden cultuur. In een bacteriënrijk lumbaalvocht moet de onmiddellijke diagnose op deze wijze evenzoo goed mogelijk zijn, doch we hadden nog geen gelegenheid dit te beproeven.

De verhouding der gewone sputumstammen tot de S- en R-varianten van Pittman.

Pittman stelt het voor, alsof gewone sputumstammen van het type Pfeiffer in R-vorm groeien. Wij zelf achten deze voorstelling onbewezen en uiterst onwaarschijnlijk. Dat de groei der R-varianten der type-specifieke meningitis- en sputumstammen veel gelijkt op die der sputumstammen is zeker, doch is niet voldoende om aan te nemen, dat deze sputumstammen evenzoo R-varianten zijn. We weten bijv. ook, dat R-pneumococcen zonder meer niet gelijk te stellen zijn aan de vergroenende streptococcen der mondholte, hoewel de kolonies volkomen op elkaar kunnen gelijken. Pittman kon bij temperaturen van 47° of hoger de subtypen a en b niet meer door agglutinatatie onderscheiden, omdat dan S- en R-varianten van beide typen door elk antiserum van één der subtypen geagglutineerd worden. Dit is in scherpe tegenstelling met hetgeen bekend is over de agglutinabiliteit van gewone sputumstammen (bij 56°), waarbij het slechts zelden gelukt, zelfs in groote groepen van stammen, serologisch indientieke stammen te vinden (o.a. Kristensen (10).

Hieruit blijkt reeds met waarschijnlijkheid, dat gewone sputumstammen niet mogen beschouwd worden als R-varianten der tot dusver bekende type-specifieke S-stammen. Daarmede is natuurlijk niet gezegd, dat in de toekomst ook bij de gewone sputumstammen geen S-R-dissociatie van anderen aard bekend zal worden.

Voorloopig mogen we slechts de diagnose „R-variant” maken, als het anti-serum van den stam in staat is bij 56° een type-specifieken S-stam tot de titergrens te agglutineeren. Ons onderzoek, vermeld in tabel II wijst hier uitdrukkelijk op.

De volgende belangwekkende feiten zijn voorbeelden er van, dat het soms wenschelijk is te weten, of een bepaalde gewone sputumstam inderdaad een R-variant is van een type-specifieken S-stam (het gaat hier ook weer om subtype b).

In een gezin stierf het jongste kindje (± 1 jaar) aan meningitis door een haemoglobino-phiele bacterie van het subtype b.

Uit de nasopharynx van de moeder, den vader en de drie zusjes werden slechts „gewone” bacteriën van Pfeiffer gekweekt (sterk positieve kweeken op Levinthal-optochine agar) en de vraag deed zich voor of er nu R-varianten van sub-

TABEL II.

Antiserum	Stammen: S = Smooth; R = Rough					
	C ₃ (S)	C ₃ (R)	L (S)	L (R)	P (S)	P (R)
C ₃ (S)	1/1600	1/1600	1/800	1/800	1/200	1/200
C ₃ (R)	1/1600	1/1600	1/800	1/800		
L (S)			1/800	1/800		
L (R)	1/12800	1/6400	1/400	1/3200		
P (S)	1/400	1/800	1/1600	1/1600	1/6400	1/6400
P (R)					1/400	1/400

type b in het spel konden zijn, te meer daar een antiserum subtype b (van onzen stam C₃ (S)) de stammen Moeder (M) en Vader (V) bij 56° sterk agglutineerde. De stammen uit de kelen der zusjes vormden geen indol en toonden geen agglutinaties met antiserum C₃ (S).

Kruisagglutinaties met een antiserum V gaf echter een totaal negatieve uitkomst met de stammen C₃ (S) en C₃ (R), zoodat wij hier niet mogen besluiten, dat stam V een R-variant was. Gelegenheid heeft ons ontbroken ook een antiserum M te onderzoeken.

Een ander dergelijk onderzoek verrichtten we met een sputumstam (Bo) van een jongen met bronchitis, die evenzoo sterk geagglutineerd werd door het antiserum C₃ (S). Ook hier gaf de kruisagglutinatie met een antiserum Bo met de stammen C₃ (S) en C₃ (R) een negatieve uitkomst.

In tabel III hebben we de gegevens samengesteld. De stammen Sie en Do zijn andere sputumstammen. De stammen I, II en III zijn die der zusjes van eerstgenoemde familie. Uit de bovenstaande gegevens volgt ook nog, dat de proteïne-lichamen der meningitisstammen van het type b wel verwant zijn met die van sommige gewone sputumstammen.

Ook in het volgende geval was het van belang om uit te maken, of een dof groeiende sputumstam een R-variant zou kunnen zijn van een bekend S-type.

We vonden in etterig sputum van een kindje, lijdende aan chronische bronchitis met bronchiëctasieën (bladz. 318) aan-

TABEL III.

Anti-serum	Stammen: + = indol positief; — = indol negatief										
	Uit meningitis-etter		Uit sputum					Uit pharynx			
	C ₃ S +	C ₃ R +	Bo +	Sie +	Do +	M +	V +	Ha +	I —	II —	III —
C ₃ S	1/1600	1/1600	1/1600	1/100	neg.	1/1600	1/800	1/100	neg.	neg.	neg.
Bo.	neg.	neg.	spontaan								
V	neg.	neg.					1/400				

vankelijk slechts een S-variant, subtype b (stam L (S)). Een maand later vonden we slechts in het sputum talrijke koloniën van haemoglobinoïde bacteriën van het gewone type van Pfeiffer. De vraag deed zich voor, of dit wellicht in R-vorm groeiende varianten zouden zijn van den eerst gevonden stam. De serologische verhoudingen tusschen een indol-positieven stam van deze kweek L (Pf) en de stammen C₁ (S) en L (R) waren als volgt (agglutinaties bij 56°):

TABEL IV.

Antiserum	Stammen: S = Smooth; R = Rough					
	C ₁ (S)	C ₃ (S)	C ₃ (R)	L (S)	L (R)	L (Pf)
C ₁ (S)	1/800	1/800	1/1600	1/400	1/3200	1/100
L (R)		1/12800	1/6400	1/400	1/3200	neg.
L (Pf)		neg.	neg.	neg.	1/200	1/3200

De stam L (Pf) was na intra-veneuse inspuiting niet virulent voor konijnen. Uit de verkregen titers besluiten we, dat de stam L (Pf) geen R-variant is van subtype b, zooals stam L (R). Van stam C₁ is het subtype niet bepaald, doch wel zeker behoort deze stam, die uit lumbaalvocht stamt, ook hiertoe (vergl. onder).

De gelegenheid heeft ontbroken om verder op dit belangrijke thema in te gaan. Op meer speculatieve beschouwingen omtrent een mogelijke spontane overgang van sputumstammen in type-specifieke stammen en over het ontstaan van „standorts-varianten”, een woord, dat ons hier geen nader inzicht geeft,

gaan we hier niet in, daar de huidige stand van het onderzoek er nog in het geheel niet rijp voor is. Voorloopig houden we ons aan de voorstelling, dat de type-specifieke S-stammen met hun thans bekende subtypen a—f een bepaald type vertegenwoordigen in de groep der haemoglobino-phiele bacteriën, streng gescheiden van de groep der gewone sputumstammen.

Belangrijk is de naamgeving van deze groep micro-organismen. Het feit, dat Pittman onder 41 meningitisstammen 37 vond te behooren tot subtype b, bewijst, dat in Amerika het meerendeel der meningitisgevallen veroorzaakt wordt door één bepaald stam-type.

Ook wij vonden onder 24 meningitis-stammen 22 van het subtype b. De overige 2 groeiden dof, zoodat een type-specifieke reactie niet verricht kon worden. Van de 24 stammen kwamen er 11 uit Utrecht, 1 uit Zaandam, 1 uit Amsterdam en de rest uit de stad en de provincie Groningen ¹⁾. Ook in ons land is dus type b wel zeker de voornaamste meningitisverwekker.

Het is verder nauwelijks aan twijfel onderhevig, dat de indertijd (1909) door Cohen beschreven bacterie met dit subtype b van Pittman identiek is. Kapsenberg heeft in 1928 voorgesteld de bacterie van Cohen wetenschappelijk aan te duiden met *haemophylus meningitidis* in tegenstelling dus met den naam *haemophylus influenzae* der Amerikaansche nomenclatuur (S.A.B.) ²⁾. De moeilijkheid is echter, zooals wij hieronder nader zullen beschrijven, dat de bacterie ook in sputum kan worden gevonden en dat er behalve subtype b meerdere subtypen bestaan.

Hoewel het niet onze taak is, hier een naam voor te stellen, willen we voorloopig de bacteriegroep benoemen met *haemophylus* Cohen-Pittman (met haar subtypen). De gewone sputumstammen onderscheiden we als hierboven met den naam *haemophylus* Pfeiffer. Beide subspecies vormen dan met de subspecies para-influenza-bacteriën de species *haemophylus influenzae*. In elk van deze subspecies zullen bij verder onderzoek waarschijnlijk nog vele subtypen afgezonderd kunnen worden.

¹⁾ We ontvingen deze door de welwillende tusschenkomst van Collega van der Hoeden, Collega Beekhuis, Collega Timmerman, Collega Ruisch en Prof. van Lookeren Campagne.

²⁾ Committee Society of American bacteriologists.

Het spreekt van zelf, dat een antiserum voor de behandeling der meningitis en (of) sepsis gericht moet zijn tegen de S-stammen van type b. De resultaten bij de behandeling dezer meningitis zijn nog gering, doch we mogen niets nalaten de zeer slechte prognose dezer aandoening te verbeteren.

Ward en Fothergill (11) geven aan, dat een dergelijk antiserum eerst dan een goede werking ontvouwt, als het tegelijkertijd met normaal complement bevattend serum wordt toegediend.

Het voorkomen van de haemophylus Cohen-Pittman bij den mensch. De vondst ervan in etterig sputum en de beteekenis hiervan.

Een eerste begin is thans gemaakt met de studie van het voorkomen van deze bacteriegroep bij den mensch. Voor de techniek van het onderzoek is het noodig, dat men beschikt over type-specifieke antisera. Tot dusverre is dat van subtype b het belangrijkste gebleken. De studie over het voorkomen der andere subtypen bevindt zich nog geheel in het begin.

De eerste cultures uit materiaal (lumbaalvocht, sputum) moeten geschieden op heldere Levinthalagarplaten en in Levinthalagarbuisjes, daar de primaire cultuur op platen soms niet goed aanslaat (wegens de gewoonlijk wat grootere droogheid dezer platen?). Men kan dan door het verschijnsel der lichtdiffractie der kolonies de vermoedelijke aanwezigheid der bacteriën vaststellen. De bevestiging der diagnose geschiedt cultureel en met type-specifiek antiserum. In de practijk heeft het geen zin de konijnenvirulentie na te gaan.

Vast staat thans het voorkomen van het type Cohen-Pittman bij gevallen van etterige meningitis. Voornamelijk subtype b speelt hier een rol. Meestal bestaat naast de meningitis een sepsis. Gevallen van primaire sepsis (Saathoff 1907) zullen vermoedelijk eveneens door dit type worden veroorzaakt. Gevallen van endocarditis, etterige arthritis, osteomyelitis en andere localisaties, verwekt door „influenza“-bacteriën, zullen in het vervolg nauwkeurig moeten worden onderzocht op het voorkomen van het type en de subtypen.

Van beteekenis voor de epidemiologie van deze meningitis is de vondst van het subtype b in de neusholte en in etterige sputa

bij infecties der luchtwegen. Pittman vond het subtype a eenmaal in de pharynx bij pharyngitis en twee maal naast pneumococcen (X-type) in sputum bij gevallen van „atypische” pneumonie (broncho-pneumonie?). Het b-type werd door haar éénmaal in de pharynx gevonden (pharyngitis), één maal in een thoraxempyeem met pneumonie en twee maal in het bloed bij pneumonie. De aetiologie dezer pneumonieën staat niet vermeld, evenmin de ouderdom der patiënten. Wij zelf vonden subtype b verscheidene malen in etterig sputum (fig. 1 en 2).

De tabel V geeft een overzicht.

De lijders daarin vermeld werden alle door ons zelf klinisch bestudeerd,

TABEL V.

<i>Patiënt:</i>	<i>Sputum:</i>
1. Kind, 6 jaar. Etterige bronchitis met bronchiëctasieën.	<i>Etterig.</i> Reincultuur van subtype b Pittman. (Stam L (S) van tabel I, II en III). Later ook type Pfeiffer. (Zie boven.)
2. Man, 32 jaar. Croupeuse pneumonie met waarschijnlijk etterige tracheo-bronchitis.	<i>Sputum rufum:</i> reincultuur pneumococcen (type niet bepaald). <i>Etterig sputum:</i> gemengde flora: pneumococcen; Gram-negatieve diplococcen; veel subtype b Pittman. (Stam P van tabel I en II).
3. Man, 34 jaar. Croupeuse pneumonie met waarschijnlijk etterige tracheo-bronchitis.	<i>Sputum rufum:</i> pneumococcen type I. <i>Etterig sputum:</i> mengflora, waaronder veel subtype b Pittman.
4. Man, 24 jaar. Postoperatieve bronchopneumonie.	<i>Etterig.</i> pneumococcen type II. Daarnaast subtype b Pittman. Geen andere micro-organismen.
5. Vrouw, 43 jaar. Postoperatieve broncho-pneumonie.	<i>Etterig.</i> Reincultuur subtype b. Pittman (Fig. 1).
6. Man, 30 jaar. Chronische bronchitis met bronchiëctasieën in de rechter onder- en bovenkwab.	<i>Etterig.</i> Reincultuur subtype c Pittman (fig. 2). Later ook kapselbacteriën van Friedländer en pneumococcen (type 6 en 33).
7. Man, 15 jaar. Postoperatieve bronchitis.	<i>Etterig.</i> Veel bacteriën van Cohen-Pittman, subtype niet bepaalbaar. Daarnaast: pneumococcen type 17.

De stammen van patiënt 1 en 2 waren sterk virulent voor konijnen bij intra-veneuze inspuiting. Het subtype c (patiënt 6) was echter slechts zwak virulent. Het eerste patiëntje stierf een half jaar na onderzoek thuis. Geen der anderen overleed. We zagen nog geen gevallen van primaire acute etterige bronchitiden met de bacterie van Cohen-Pittman in het sputum. Tot dusverre vinden we steeds bij „primaire” acute gevallen het type Pfeiffer. Verder onderzoek zal ons hier verder moeten leeren. We zien echter, dat het type Cohen-Pittman in de gemeenschap circuleert over de slijmvliezen der luchtwegen en niet zeldzaam in sputa kan worden gevonden.

We vonden de bovengenoemde 7 type-specifieke stammen (waarvan 5 subtype b) op ongeveer 100 stammen in het totaal uit sputum geïsoleerd.

Op deze wijze wordt ook begrijpelijk, dat men meningitis-gevallen kan vinden in aansluiting aan katarrhale aandoeningen in een bepaalde familie (Straub (12). Voor zoover wij weten, is het nog niet bekend geworden, dat in een gezin werkelijk een gezonde of zieke drager is gevonden.

Waarom juist jonge kinderen worden aangetast door de meningitis is nog een raadsel.

We zien tevens, dat het vinden van de bacterie van Cohen-Pittman bij volwassenen in sputum geen ernstige beteekenis voor den lijder behoeft te hebben. De hier beschreven acute gevallen hadden alle een gunstig verloop. Ook van het heerschen van influenza is de vondst dezer bacteriën in sputum geheel onafhankelijk.

De onafhankelijkheid van het optreden van de etterige meningitis door haemoglobinoïde bacteriën van dat van dat van epidemische en pandemische influenza is algemeen erkend.

Ons jarenlang verricht onderzoek over het voorkomen van de bacterie van Pfeiffer heeft ons de overtuiging geschonken, dat ook deze bacterie ten allen tijde, onafhankelijk van het heerschen van influenza, in etterige sputa kan worden aangetroffen. We hebben goede gronden aan te nemen, dat deze bacterie de belangrijkste verwekker is van acute en chronische cellig-etterige ontsteking van het bronchiën-slijmvlies, zoodat deze groep micro-organismen in de pathologie van de acute en chro-

nische etterige bronchitis en broncho-bronchiolitis de belangrijkste rol speelt.

In de bovenbeschreven gevallen nemen we aan, dat de bacterie van Cohen-Pittman evenzoo de ettering op de slijmvliezen der bronchi heeft verwekt, hetzij alleen, hetzij in samenwerking met de andere gevonden bacteriën. In geen enkel geval behoeven we aan te nemen, dat deze bacterie-soort mede de verwekker was van de pneumonie, daar de pneumonische sputa de bacterie niet bevatte.

Zusammenfassung:

Die Beobachtungen von M. Pittman aus dem Jahre 1932 über der Typenspezifität von hämoglobinophilen Bakterien die bei Kranken, die an eitriger Meningitis litten, gezüchtet worden sind, werden bestätigt.

Die Typen-spezifischen Stämme wachsen anders auf Levinthalagar als Pfeiffer-bakterien, die aus Sputa gezüchtet wurden, nämlich mit starker Lichtdiffraktion der Kolonien bei stark durchfallendem Kunst- oder Sonnenlicht. Die meisten Stämme, die von eitriger Meningitis in Holland gezüchtet wurden, gehören zu einem bestimmtem Typ (b). Diese töten Kaninchen nach einer intravenösen Injektion mit starker Bakteriämie.

Eine Schneldiagnose des Typus ist durch Objektglasagglutination in der Kälte mit typenspezifischem Serum möglich, geradeso wie beim Pneumococcus.

Da die durch Cohen 1909 beschriebenen Bakterien sehr wahrscheinlich für identisch mit diesem Typ b gehalten werden müssen, schlagen wir hiermit vor, die ganze Bakteriengruppe vorläufig mit „Typus Cohen—Pittman“ anzudeuten im gegensatz zum Typus Pfeiffer. Pittman fand in dieser Gruppe schon 6 Untertypen (a-f).

Es ist wichtig, dass diese Gruppe auch in eitrigem Sputa gefunden wird. Unter ungefähr 100 Sputumstämmen fanden wir 7 mal typenspezifische Stämme und zwar 5 mal Typus b, einmal Typus c und einmal einen noch nicht bestimmten Typus. Die Sputa stammen von klinisch durch uns selbst beobachteten Kranken, die an chronischer Bronchitis, Pneumococcenpneumonien und postoperativen Bronchopneumonien erkrankt waren. Die Fälle traten völlig unabhängig von einer Influenzaepidemie

auf. Wir schreiben dieser Gruppe Bakteriën das Vermögen zu, zellig-eitrige Bronchitis zu verursachen, ebenso wie wir dies dem Typ Pfeiffer zuschreiben. Mit der Aetiologie der Influenza hat der Typus Cohen—Pittman nichts zu tun. R-Varianten, die in vitro entstanden sind, wachsen wie Stämme des Pfeiffer-bazillus. Wir halten es jedoch für äusserst unwahrscheinlich, dass der Pfeiffer bazillus ohne weiteres als R-Variante von typenspezifische Stämmen betrachte werden darf.

Die Misserfolge früherer Autoren, denen es nicht glückte mit Meningitisstämmen Kaninchenvirulenz zu zeigen, beruhen wahrscheinlich auf der Tatsache, dass diese Untersucher ohne es zu wissen, mit R-Stämmen gearbeitet haben!

LITERATUUR.

- (1) Cohen, Méningite cérébrospinale septicémique. Annales l'Institut Pasteur. 1909.
- (2) M. Wollstein, Serumtreatment of influenzal meningitis. Journal of exp. med., 1910, 1915.
- (3) Rivers en Kohn, The biology and the serologic reactions of influenza. bacilli producing meningitis. Journ. exp. med. vol. 341, 1921.
- (4) Neal, Jackson en Appelbaum, The Journal of the Am. Med. Ass. 1934, Vol. 102. No. 7.
- (5) Kapsenberg, Bacil van Cohen en meningitis. Nederl. Tijdschr. v. hygiëne, microbiologie en serologie, 1929.
- (6) M. Pittman, Variation and type specificity in de bacterial species haemophilus influenzae. Journal of experimental med. 1931.
M. Pittman, The action of Type specific hemophylus influenza anti-serum. Journal of experimental medicine, 1933.
- (7) J. Mulder, Luchtwegkatarrhen en de aetiologische beteekenis daarbij van haemoglobinophile bacteriën. Geneesk. Tijdschr. v. Ned.-Indië, 1932.
- (8) Pijper, The Medical Journal of South Africa, 1918.
Pijper, Medical Record 1923, 1925.
Pijper, Journal Med. Ass. of South Africa, 1927.
- (9) J. Mulder, B. van der Meer, W. Lacroix en H. Oesenburg, Vergelijkende waarnemingen over haemoglobinoph. bacteriën, geïsoleerd uit sputa en meningitisetters. Nederl. Tijdschr. voor Geneesk. 1934, bl. 2853.
- (10) Kristensen. Investigations into the occurrence and classification of the haemoglobinophilic Bacteria. Kopenhagen. Levin & Munksgaard. 1922.
- (11) Ward en Fothergill. American J. Diss. children. 1932, 43. 873.
- (12) M. Straub. Kindersterfte ter Oostkust van Sumatra. Diss. A'dam. 1927.

Over de activeering van de filtreerbare elementen van den tuberkelbacil door middel van inspuitingen met het aceton-extract van Kochsche bacillen¹⁾

DOOR

R. STOOP,
arts te Vlaardingen.

Het is met een zekeren schroom, dat ik U de resultaten mededeel van de onderzoekingen, die ik verrichtte over de filtreerbare elementen van den tuberkelbacil; met schroom, omdat deze mededeeling weer een vermeerdering beteekent van den vrijwel onoverzienbaren stroom publicaties op dit gebied en met nog meer schroom, omdat de resultaten in geen en deele in overeenstemming zijn met de verwachtingen, die ik koesterde. Gedurende een langdurige stage aan het Institut Pasteur te Parijs maakte ik kennis met de resultaten van de onderzoekingen over de filtreerbare elementen van den tuberkelbacil en aangestoken door het groote enthousiasme, waarmede toendertijd deze questies behandeld werden, was ik gaarne bereid om de experimenten op verzoek van van Deinse te herhalen in een tuberculose vrije omgeving. Door de groote bereidwilligheid van Professor Bakker en wijlen Professor Söhngen te Wageningen was het mij mogelijk aan dezen eisch te voldoen.

De techniek, die ik gebruikte, was rigoureuze dezelfde als die te Parijs; ook het materiaal als glaswerk, kaarsen, cultures, etc. kwam uit het Institut Pasteur te Parijs; alleen de proefdieren waren Hollandsch. Op deze wijze hoopte ik zooveel mogelijk fouten uit te schakelen. In den loop der tijden is de techniek nog al eens gewijzigd, waardoor veel misverstanden zijn ontstaan. Ik geef alleen de techniek, zooals deze uiteindelijk

¹⁾ Voordracht gehouden op de vergadering van de Nederl. Ver. voor Microbiologie op 14 November 1936.

is vastgesteld en laat de verouderde methodes buiten bespreking. Als uitgangspunt voor de filtratie gebruikte ik organen van tuberculeuse caviae. De proefdieren werden 10—20 dagen voor de filtratie besmet met 10 mgr., een maand oude, op Loewestein gegroeide cultuur, die subcutaan in de lies wordt ingespoten. Nadat het dier is afgemaakt, worden lever, milt en bronchiaalklieren met steriel zand in een steriele mortier fijn gewreven en daarna met 150 cc steriel physiologisch water tot een homogene massa verwerkt; vervolgens drie minuten centrifugeeren op 3000 toeren en snel filtereeren op papier Chardin, type carton; daarna komt de filtratie op de kaars Chamberland L 1. Deze drie bewerkingen hebben voornamelijk tot doel het zand en grove partikels te verwijderen. De filtratie op Chamberland L 2 is de belangrijkste bewerking in het procédé; daarom zijn er eenige speciale eischen, waaraan deze filtratie moet voldoen. De L 2 moet luchtdicht zijn, gecontrôleerd op de manier van Calmette, al weten wij, dat er op deze wijze misschien eenige fouten kunnen ontstaan, getuige het onderzoek van Emanuels; de kaars moet steriel zijn. De filtratie geschiedt, evenals bij de filtratie op de L 1, van buiten naar binnen, terwijl de druk, waarbij men werkt, niet hoger mag zijn dan 20 cm Hg; de duur van de filtratie per kaars mag de 15 minuten niet overschrijden. Deze twee laatste voorwaarden vinden hun bestaansrecht in het feit, dat de filtratie geen filtratie in den engeren zin van het woord is, maar een ingewikkeld proces is, dat berust op een aantal factoren, waaronder de electriche lading van de kaars en de te filtereeren deeltjes een zeer groote rol speelt.

Bij de contrôle op het filtraat heb ik mij evenals van Deinse op het standpunt gesteld, dat de biologische contrôle de beste is; m.a.w. krijgen de contrôledieren geen tuberculose, ook na een zeer langen waarnemingstijd, dan meen ik, dat wij gerechtigd zijn aan te nemen, dat er geen levensvatbare virulente bacillen zich in het filtraat bevonden. De proeven van Plotz leverden niet het bewijs, dat hij met levende, virulente bacillen te maken had. Ook de proeven van Walker en Sweeney leveren geen eclatant bewijs, daar het meerendeel van hun proefdieren zonder injecties van het aceton-extract al een floride tuberculose kregen. Het is daarom van het grootste belang de contrôledieren lang in leven te laten, opdat een eventuele in-

fectie met een zeer enkelen bacil den tijd heeft zich te ontwikkelen.

Het filtraat wordt bij een aantal caviae intraperitoneaal ingespoten; de helft wordt als contrôledieren bewaard; de andere helft wordt twee keer per week ingespoten met een aceton-extract van tuberkelbacillen. Bij hun onderzoekingen omtrent de biologische eigenschappen van de diverse chemische fracties van den tuberkelbacil vonden Boquet en Nègre, dat de lipoïden, die door methylalcohol uit van tevoren door aceton geëxtraheerde tuberkelbacillen konden worden opgelost, zoowel een antigeen waren als een gunstigen invloed hadden op tuberculeuse laesies; door de onderzoekingen van Macheboeuf, Dieryck en mij werd de aard van deze stoffen nader geprecisieerd. De acetonfractie bleek een activeerende werking te hebben op tuberculeuse aandoeningen; het lag dus voor de hand te probeeren, of de injecties met het aceton-extract ook een activeerende werking hadden op de filtreerbare elementen van den tuberkelbacil. Er werd twee maal per week ingespoten een suspensie, die per cc overeen kwam met 10 mgr gedroogde bacillen. Reeds in hun eerste serie proeven hadden Nègre en Valtis succes na ongeveer 16 injecties; later moest dit aantal vermeerderd worden, zoodat tenslotte als maatstaf werd aangenomen, dat minstens gedurende een maand of vijf gespoten moest worden, eer men de proef als beëindigd mocht beschouwen.

De aangegeven techniek heb ik zeer nauwkeurig opgevolgd; het aceton-extract werd mij telkenmale bereidwillig door van Deinse gestuurd. De tuberkelbacillenstammen waren op een uitzondering na typische humane en bovine stammen. Humaan waren: Prigeant, Roux, Nitchoun en de Leidsche Humanus C 19; bovien was de uiterst virulente stam Bovine 1. Tenslotte had ik de beschikking over den stam Chrétien, die verkregen was uit het bloed van een patiëntje, dat leed aan endocarditis rheumatica. De proefdieren werden zoolang mogelijk in leven gelaten; er werden zooveel mogelijk cultures volgens Loewestein aangelegd en zoo noodig passages verricht. Positief rekende ik alleen een resultaat, dat zoowel een macroscopisch tuberculeus sectiebeeld tezamen met een positieve cultuur vertoonde.

Allereerst wil ik de resultaten van een kleine serie proeven

ter contrôle van het aceton-extract gedaan bespreken. Deze serie is klein, ja te klein; zij was weliswaar groot opgezet, doch het grootste gedeelte van de proefdieren is voortijdig aan een massale epidemie ten gronde gegaan, terwijl het nog te vroeg was om een eventueelen invloed van het extract na te gaan. Uit financiëele overwegingen was ik gedwongen er vanaf te zien de serie opnieuw in te zetten. Twee dieren zijn 8 en 12 maanden lang met het aceton-extract ingespoten; bij sectie vertoonden zij geen spoor van tuberculose; ook de cultures volgens Loewestein bleven negatief. Bij een derde cavia kwam in de tweede passage een gegeneraliseerde tuberculose te voorschijn; de cultuur werd zoowel door Boer als van Deinse gedetermineerd als een bovine stam met de groeiwijze van een humane. Ik neem aan, dat wij hier met een spontaaninfectie te maken hebben, die een enkelen keer voorkomt; van een infectie onder mijn proefdieren kan geen sprake zijn, want het bleef bij dit eene geval. Valtis en van Deinse beschrijven een groote serie ter contrôle van het acetoneextract, waarbij zij geen enkel geval van tuberculose ontmoetten, zelfs niet bij meerdere passages.

Mijn filtratieonderzoek beperkte ik tot het vervaardigen van orgaanfiltraten; voor cultuurfiltraten, die in wezen niet van de orgaanfiltraten verschillen, ontbrak mij het noodige materiaal. Op de reeds besproken manier verrichtte ik 18 filtraties, waarbij in de eerste series nog al eens een passage voorkwam, zoodat ik in het geheel een 100-tal dieren gebruikte. In de serie met den stam Prigeant leefden de dieren, die met het aceton-extract behandeld waren, 6 maanden, zonder dat er bij sectie iets van tuberculose te bespeuren was; van een van de dieren maakte ik een passage, die na vijf maanden stierf; ook hier was geen spoor van tuberculose te vinden. Een van de contrôledieren leefde ongeveer 14 maanden; de sectie, noch de cultuur leverden iets bijzonders op.

In de series met den stam Roux had ik met dezelfde epidemie te kampen, die onder de serie van de aceton-contrôledieren zoo'n opruiming hield. Hier verrichtte ik vrij wat passages, die ook geen invloed op het activeeren van de filtrabele elementen mochten hebben. Mijn ervaringen met de series van den stam Chrétien waren al even teleurstellend, zoodat ik daarna slechts nog bij wijze van uitzondering een passage maakte. De series met de stammen Bovine 1, Leidsche Humanus C 19 en Nitchoun

leverden evenzoo een volkomen negatief resultaat op, zoodat het onnoodig is deze uitvoerig te bespreken.

Deze negatieve resultaten zijn des te verwonderlijker en des te teleurstellender, als men ziet, dat het Boer en mij in een vooronderzoek en Boer later wel gelukt was uit de met aceton-extract behandelde dieren, die tevoren met filtraat geënt waren, de weinig gefixeerde stammen, zooals Valtis en van Deinse ze beschrijven, te isoleeren. Een tegenspraak, die op het eerste gezicht niet te verklaren is en die des te opvallender is, omdat het in het buitenland vrijwel aan niemand anders gelukt was de resultaten van het Institut Pasteur te bevestigen. Professor Flu en zijn medewerkers konden bij hun onderzoekingen nooit een positief resultaat boeken. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn, dat er iets met de bereiding van het aceton-extract zou zijn veranderd; bij navraag bleek dat inderdaad het geval te zijn; terwijl vroeger de ongezuiverde aceton Poulenc gebruikt werd, was den laatsten tijd op aandringen van de chemische afdeling gezuiverd aceton genomen. In hoeverre deze wijziging de werkzaamheid van het extract heeft veranderd, is nog een open vraag; een feit is het, dat men op het Institut Pasteur met dezelfde negatieve resultaten te kampen heeft. Een duidelijke verklaring is echter niet te geven.

Tusschen mijn voorloopige proeven met Boer en deze uitgebreide reeks is een groot punt van overeenkomst: onze con-trôledieren hebben nooit of te nimmer een spoor van tuberculose vertoond. In geval, dat er toch eenige zeer weinige, virulente bacillen door het filter geglipt waren, zou ik in deze langdurige waarnemingstijden zeker gevallen van paucibacillose, zooals Doerr ze beschrijft, hebben gezien. Mijn proefreeksen wettigen dus zeker de conclusie, dat er geen levende virulente bacillen door het filter heenglippen, zooals reeds meerdere malen werd verondersteld. Of er überhaupt iets door het filter komt in den vorm van splitter of granulae of zelfs van heele bacillen, die dan grondig van eigenschappen zouden moeten zijn veranderd, of dat wij werkelijk met een ultravirus te maken hebben, is een vraag, waarop ik mij geen antwoord vermeet te geven.

Ook geven mijn reeksen geen steun aan hen, die aangenomen hebben, dat er in het aceton-extract levende virulente bacillen aanwezig zouden zijn. Het eenige positieve geval in

de serie ter contrôle van het extract staat volkomen op zich zelf; waren er in die portie extract werkelijk bacillen aanwezig geweest, dan hadden meerdere dieren een tuberculose moeten krijgen.

Over de bestaansmogelijkheden van de filtreerbare elementen van den tuberkelbacil kan ik mij niet zoo positief uitlaten; ware ik er niet rotsvast van overtuigd, dat de een of andere onbekende factor de oorzaak is geweest van het verschil in uitkomst tusschen deze reeksen eenerzijds en de voorloopige serie en de experimenten van van Deinse anderzijds, die nu ook met dezen tegenslag heeft te kampen, dan zou ik uit mijn proeven slechts tot het niet bestaan van de filtrabele elementen concludeeren. Nu echter hoop ik, dat het gelukken mag deze onbekende factor te definiëeren, zoodat hij geëlimineerd kan worden en het probleem van de filtreerbare elementen in gunstigen zin opgelost worden.

VERKORTE SECTIE-VERSLAGEN.

Contrôle op het Aceton-extract.

Cavia 5 werd van 3—4—34 tot 28—5—35 met AE ingespoten; sectie: niet de minste afwijkingen; de cultuur was op 7—8—35 steriel gebleven.

Cavia 99 werd van 3—5—35 tot 8—1—36 behandeld; bij sectie geen afwijkingen; de cultuur was op 1—5—36 negatief.

Cavia 54 werd van 1—3—35 tot 26—3—35 met AE behandeld; passage op cavia 63, die op 16—4—35 stierf; passage op cavia 80, die op 10—10—35 stierf aan gegeneraliseerde tuberculose. De verkregen cultuur werd zoowel door Boer op het Instituut voor Preventieve Geneeskunde te Leiden als door Van Deinse te Parijs gedetermineerd; hun beider conclusie luidde een bovine stam met groeiwijze van een humane. Dus een zoogenaamde intermediaire stam.

De overige negen caviae van deze serie stierven allen voortijdig.

Filtratie met de stam Prigeant.

14—11—34 filtratie van de organen van de op 31—10—34 besmette cavia. Cavia 36 en 38 worden met AE behandeld; cavia 37 en 39 zijn contrôles. Cavia 36 sterft 18—4—35; sectie: geen afwijkingen; passage op cavia 94, die 12—9—35 sterft; sectie: geen tuberculose; cultuur: 7—10—35 microscopisch negatief.

Cavia 38 leeft tot 20—4—35, evenals cavia 39; beide vertoonen bij sectie geen spoor van tuberculose.

Cavia 37 wordt op 13—1—36 afgemaakt; sectie: geen tuberculose; cultuur op 1—5—36 negatief.

Filtraties met de stam Roux.

Eerste serie:

25—10—34 filtratie der organen van de op 11—10—34 geïnfecteerde cavia. Cavia 32 en 34 worden met AE behandeld; cavia 33 en 35 contrôles.

Cavia 32 sterft voortijdig; geen sectie. Cavia 34 wordt op 28—11—35 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur op 3—1—36 microscopisch negatief.

Cavia 33 sterft in de Kerstvacantie; geen sectie.

Cavia 35 sterft op 12—11—34; passage op cavia 12, die leeft tot 29—3—35; passage op cavia 64, die sterft op cavia 16—4—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 1—9—35 negatief.

Tweede serie:

14—2—35 filtratie der organen van een op 16—1—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 14 en 15 krijgen ieder 15 cc intraperitoneaal; zij worden met AE behandeld. Cavia 3 en 18 krijgen slechts 5 cc; zij dienen als contrôles.

Cavia 3 sterft voortijdig; geen sectie. Cavia 18 sterft 18—3—35; sectie: vrij veel vocht in de buikholte; verder geen afwijkingen; cultuur op 4—5—35 negatief. Passage op cavia 51, die 2—4—35 sterft; passage op cavia 72, gestorven op 5—4—35, sectie: geen afwijkingen; cultuur op 17—6—35 negatief.

Cavia 14 sterft reeds 2—3—35; sectie: zeer licht gezwollen lumbaal-klieren; cultuur: 4—5—35 negatief. Passage op cavia 57, gestorven op 6—4—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 17—6—35 negatief.

Cavia 15 sterft 26—3—25; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 28—5—35 negatief. Passage op cavia 62, gestorven op 19—4—35; sectie: geen afwijkingen.

Derde serie:

19—2—35 filtratie der organen van een op 16—1—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 28 en 52 worden met AE behandeld; cavia 31 contrôle.

Cavia 31 sterft op 20—4—35; sectie: geen afwijkingen; door tekort aan materiaal geen cultuur of passage.

Cavia 28 sterft 6—4—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 20—5—35 negatief.

Cavia 52 leeft tot 24—9—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 3—1—36 negatief.

Filtraties met de stam Chrétien.

Eerste serie:

23—1—35 filtratie der organen van een op 9—1—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 44 en 46 worden met AE behandeld; cavia 45 en 47 contrôles.

Cavia 47 sterft voortijdig; geen sectie. Cavia 45 sterft op 2—4—35; sectie: geen tuberculeuse afwijkingen; passage op cavia 71, die 3—5—35 sterft. Bij sectie geen afwijkingen te vinden.

Cavia 44 sterft 2—3—35; passage op cavia 56, die tot 17—4—35 leeft; bij sectie geen duidelijke afwijkingen; cultuur: 7—8—35 negatief; passage

op cavia 83, die sterft op 19—9—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 8—12—35 negatief.

Cavia 46 sterft 3—4—35; sectie: enkele fijne kliertjes op de injectieplaats, licht vergroote lumbaal en bronchiaalklieren. Cultuur: 7—8—35 geen groei. Passage op cavia 86, die sterft op 7—9—35; sectie: geen duidelijke afwijkingen; cultuur: 8—12—35 negatief.

Tweede serie:

29—1—35 filtratie der organen van een op 9—1—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 48 en 50 worden met AE behandeld; cavia 49 contrôle. Deze dieren kregen slechts 5 cc ingespoten.

Cavia 49 sterft 2—4—35; sectie: geen afwijkingen; passage op cavia 73, die 16 dagen later sterft; weer passage op cavia 85, die leeft tot 3—5—35; bij de sectie worden ook hier geen afwijkingen gevonden.

Cavia 48 sterft 18—4—35; passage op cavia 95, die 28—11—35 afgemaakt wordt; sectie: geen bijzonderheden; cultuur: 19—2—36 negatief.

Cavia 50 wordt 28—11—35 afgemaakt; bij sectie enkele kleine kliertjes op de injectieplaats; cultuur op 19—2—36 negatief.

Derde serie:

20—5—35 filtratie der organen van een op 4—5—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 125 wordt met AE behandeld; cavia 128 contrôle.

Cavia 125 wordt op 6—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur 1—5—36 negatief.

Cavia 128 sterft 24—1—36; sectie: niet bijzonders; cultuur: negatief op 1—5—36.

Vierde serie:

21—5—35 filtratie der organen van een op 4—5—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 132 wordt met AE behandeld; cavia 131 contrôle. Cavia 132 wordt 6—1—36 afgemaakt; bij sectie geen afwijkingen; cultuur negatief op 1—5—36.

Cavia 131 sterft 24—1—36; sectie: geen tuberculose; cultuur: negatief op 1—5—36.

Vijfde serie:

22—5—35 filtratie der organen van een op 4—5—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 133 en 135 worden met AE behandeld; cavia 134 en 136 contrôles.

Cavia 133 sterft 27—9—35; passage op cavia 157, die 20—1—36 afgemaakt wordt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 135 afgemaakt op 20—1—36; sectie: geen duidelijke bijzonderheden; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 134 wordt 24—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 136 wordt ook op 24—1—36 afgemaakt; sectie: als boven; cultuur: 1—5—36 negatief.

Filtaties met de stam Bovine 1.

Eerste serie:

20—3—35 filtratie der organen van een op 14—3—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 58 en 60, die met AE worden behandeld krijgen 15 cc intraperitoneaal ingespoten; de contrôles cavia 59 en 61 ieder 10 cc.

Cavia 59 sterft 18—4—35; passage op cavia 93, die 13—1—36 wordt afgemaakt; sectie vertoont geen afwijkingen; de cultuur is op 1—5—36 negatief.

Cavia 61 sterft 16—4—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 7—8—35. Passage op cavia 81, die echter voortijdig sterft.

Cavia 58 sterft 22—4—35; sectie: enkele fijne kliertjes op de injectieplaats; licht vergroote lumbaalklieren; passage op cavia 97, die 8—12—35 wordt afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 29—2—36.

Cavia 60 sterft 18—4—35; bij sectie een licht vergroote milt en enkele kleine kliertjes op de injectieplaats; passage op cavia 91 en 92, die leven tot 8—12—35; bij sectie geen bijzonderheden; cultuur: negatief op 29—2—36.

Tweede serie:

18—4—35 filtratie der organen van een op 6—4—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 87 en 88 worden met AE behandeld; cavia 90 contrôle.

Cavia 87 wordt 8—12—35 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur op 29—2—36 negatief.

Cavia 88 sterft op 26—9—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Derde serie:

24—4—35 filtratie der organen van een op 9—4—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 102 en 104 worden met AE behandeld; cavia 120 contrôle.

Cavia 102 wordt 3—1—36 afgemaakt; sectie: geen duidelijke afwijkingen; cultuur negatief op 1—5—36.

Cavia 104 wordt 3—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur negatief op 1—5—36.

Cavia 120 sterft 26—5—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur negatief op 13—9—35; passage op cavia 155, die afgemaakt wordt op 13—1—36; sectie: geen afwijkingen; cultuur negatief op 1—5—36.

Vierde serie:

1—5—35 filtratie van de organen eener op 9—4—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 106 en 108 worden met AE behandeld; cavia 107 contrôle.

Cavia 105 sterft 26—6—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 8—8—35; passage op cavia 156, die 1—9—35 sterft; geen sectie door bijzondere omstandigheden

Cavia 106 wordt 8—12—35 afgemaakt; sectie: geen duidelijke bijzonderheden; cultuur: negatief op 29—2—36.

Cavia 108 wordt 8—12—35 afgemaakt; sectie: geen bijzonderheden; cultuur: negatief op 29—2—36.

Vijfde serie:

18—5—35 filtratie der organen van een op 7—5—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 122 en 124 worden met AE behandeld; cavia 121 en 123 contrôles.

Cavia 122 wordt 7—1—36 afgemaakt; sectie: geen duidelijke bijzonderheden; cultuur: 1—5—36 negatief.

Cavia 124 wordt ook 7—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen cultuur: 1—5—36 negatief.

Cavia 121 sterft 1—10—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: 6—1—36 negatief.

Cavia 123 afgemaakt 15—1—36; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief.

Zesde serie:

23—5—35 filtratie der organen van een op 7—5—36 geïnfecteerde cavia.

Cavia 138 en 140 worden met AE behandeld; cavia 137 en 139 contrôles.

Cavia 138 wordt 7—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 140 wordt 7—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 137 wordt 22—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief

Cavia 139 wordt op 22—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief.

Filtratie met de stam Leidsche Humanus C. 19.

28—5—35 filtratie der organen van een op 8—5—35 geïnfecteerde cavia. Cavia 141 en 143 worden met AE behandeld; cavia 142 en 144 contrôles.

Cavia 142 sterft 8—8—35; geen sectie door bijzondere omstandigheden.

Cavia 144 wordt 15—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 141 wordt 15—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur negatief op 1—5—36.

Cavia 143 sterft op 18—9—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief.

Filtraties met de stam Nitchoun.

Eerste serie:

29—5—36 filtratie der organen van een op 13—5—35 geïnfecteerde cavia.

Cavia 146 en 148 worden met AE behandeld; cavia 145 contrôle.

Cavia 146 wordt 15—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief

Cavia 148 sterft 25—9—35; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief.

Cavia 145 wordt 22—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Tweede serie:

29—5—36 filtratie der organen van een op 13—5—36 geïnfecteerde cavia. Cavia 150 en 152, die ieder 15 cc filtraat intraperitoneaal ingespoten krijgen, worden met AE behandeld; cavia 151 contrôle.

Cavia 150 wordt 20—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Cavia 153 wordt 20—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief.

Cavia 151 wordt 22—1—36 afgemaakt; sectie: geen afwijkingen; cultuur: negatief op 1—5—36.

Indien niet anders vermeld is, werd 10 cc filtraat intraperitoneaal ingespoten. Het aanleggen van de cultures geschiedde steeds op de methode Loewestein op den voedingsbodem met malachietgroen van Loewestein, welwillend door Boer verstrekt. Er werd geïnfecteerd met 10 mgr. een maand oude cultuur, gegroeid op Loewestein.

LITTERATUUR.

- H. D. Boer*: Activeering van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil door aceton-extract van tuberkelbacillen. Instituut voor Preventieve Geneeskunde. 1934.
- H. D. Boer en R. Stoop*: Activeering van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil. Instituut voor Preventieve Geneeskunde. 1934.
- A. Boquet et L. Nègre*: Actions des divers constituants du bacille de Koch sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. C. R. Académie des Sciences. Séance du 3—3—24.
- F. van Deinse*: De filtreerbare elementen van den tuberkelbacil. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. Jg. 74, no. 13. 29—3—30.
- F. van Deinse*: Nieuwe onderzoekingen over het filtreerbare tuberculose virus en zijn beteekenis voor de kliniek. Verslagen van de Tuberculose Bestrijdingscommissie. 1932.
- F. van Deinse*: Sur une souche de bacilles acido-résistants, isolée de trois cobayes inoculés avec l'ultravirus tuberculeux et traités à l'extrait acétonique de bacilles de Koch. C. R. Soc Biol. CVLII, p. 669. 1931.
- F. van Deinse*: Nieuwe wegen in de bacteriologische diagnostiek der tuberculose. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. Jg. 78, p. 1407. 1934.
- Doerr*: Zeitschr. für Imm. und exp. Ther. Bd. 74, 1932.
- Prof. P. C. Flu*: Onderzoekingen over het voorkomen van een bijzonderen filtreerbaren of ook ultravorm van den tuberkelbacil. Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde. 78. p. 933 en 3019. Acta Leidensia, Vol. 8. 1933.
- Prof. P. C. Flu*: Over het tuberculeus ultravirus en de vormen van tuberkelbacillen Maandschr. v. Kindergeneesk. 1935, p. 385.
- Macheboeuf, Dieryck et Stoop*: Etudes chimiques sur les bacilles tuberculeux 2. Extraction fractionnée des diverses substances lipoïdiques de bacilles frais et non chauffés. Annales de l'Institut Pasteur. T. 54 p. 71. 1935.
- L. Nègre et J. Valtis*: Action des extraits acétoniques de bacilles de Koch sur les propriétés pathogènes des éléments filtrables du virus tuberculeux. Annales de l'Institut Pasteur, XLVI, p. 587, 1931.
- Harry Plotz*: Contribution à la discussion sur l'existence de l'ultravirus tuberculeux. Presse Médicale. 1935, p. 1438.
- Harry Plotz*: Sur la filtrabilité du bacille de Koch. C. R. Académie des Sciences. 199, p. 387. 1934.
- J. Valtis*: Le Virus tuberculeux. Masson et Cie. 1932.
- J. Valtis et F. van Deinse*: Sur les variations des caractères de culture des bacilles issus des éléments filtrables du virus tuberculeux. Annales de l'Institut Pasteur. LI, p. 419, 1933.

- J. Valtis en F. van Deinse*: Bijdrage tot de studie der tuberkelbacillenstammen voortkomende uit de filtreerbare elementen van het tuberculose virus. Ned. Tijdschr. v. Hyg. Microbiol. en Serol. Deel 8. 1934.
- J. Valtis et F. van Deinse*: Recherches sur les variations biologiques du virus tuberculeux. Annales de l'Institut Pasteur, LIII, p. 51. 1935.
- J. Valtis en F. van Deinse*: Eenige onderzoekingen over het filtreerbare tuberculose virus. Antonie van Leeuwenhoek. Deel I. 1934.
- J. Valtis et F. van Deinse*: Sur l'existence de bacilles tuberculeux du type mammifère intermédiaire. C. R. Soc. Biol. CXIX, p. 823. 1935.
- J. Valtis, G. Paiseau et F. van Deinse*: Présence du virus tuberculeux dans le sang circulant d'un enfant atteint d'endocardite rhumatismale. C. R. Soc. Biol. CXII, p. 742. 1933.
- E. L. Walker and M. A. Sweeney*: the Journal of infectious Diseases. Vol. 54, 1934.
-

Over het vetsplitsend vermogen van Staphylococen

DOOR

Dr. N. VAN DER WALLE.

Inleiding.

Een groot aantal microörganismen (schimmels en bacteriën), welke algemeen verspreid in de natuur voorkomen, zijn in staat vetten aan te tasten. Dit kan geschieden:

1. door oxydatie;

2. door hydrolyse, waarbij glycerine en vetzuren ontstaan.

Over de eerste wijze van omzetting zijn weinige, (o.a. van *Derx*) (5), over de tweede zeer vele onderzoekingen verricht.

Allen, die over dit vraagstuk mededeeligen hebben gedaan, zijn het erover eens, dat deze hydrolyse tot stand komt onder invloed van een vetsplitsend ferment, een *lipase*.

Het waren vnl. botanici en landbouwbacteriologen, die met behulp van een of meer der te bespreken methoden, het lipolytisch vermogen van bacteriën bestudeerden.

Het vraagstuk is van belang voor de kennis van het proces van het rans worden van boter. *Orla Jensen* (13) ontdekte na een uitvoerig onderzoek, dat deze omzetting veroorzaakt, althans ingeleid wordt door de werking van microörganismen. *Jacobsen* (12) verrichtte een overeenkomstig onderzoek voor margarine.

König, *Spieckermann* en *Bremer* (a) bestudeerden de omzetting van het vet van veekoeken; in één jaar kan het gehalte van 10—12 % tot eenige procenten worden gereduceerd. *Rubner* (b) onderzocht het vetsplitsend vermogen van grond-

¹⁾ (a), (b), (c) geciteerd uit *Söhngen* (17).

bacteriën en vond dat in een jaar tijds ongeveer 50 % van het aan den grond toegevoegde vet wordt gesplitst. *Bechhold* (c) toonde aan, dat vetten en zeepen in den modder der inrichtingen van de stadsreiniging te Stettin door bacteriewerking verdwijnen.

De medische bacteriologie had voor dit vraagstuk nog weinig belangstelling. *Turner* (22) gebruikte de nijlblauwmethode voor het onderzoek van faecesbacteriën bij pellagra, spruw en pernicieuse anaemie; hij bestudeerde de faeces van 15 patiënten en isoleerde 10 stammen, welke lipolytisch werkten. Naar een duidelijke conclusie zoekt men in zijn mededeeling tevergeefs.

Overigens vond ik geen publicaties, welke voor de klinische of differentieele diagnostiek van belang zijn.

Met zekerheid is slechts bekend uit de onderzoekingen van *Eijkman* (6), *Michaëlis* en *Rona* (15) e.a. dat van de bacteriën, welke een pathogene rol kunnen spelen, enkele krachtig, andere zwak en weer andere in het geheel niet lipolytisch werken. Van een verband tusschen deze eigenschap en de door deze bacteriën veroorzaakte ziekteverschijnselen is niets bekend.

Eijkman vond met de door hem aangegeven vetplaat lipasewerking bij *B. pyocyaneus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *B. prodigiosus*, *B. fluorescens*. Negatief waren: *B. anthracis*, *B. coli*, *B. typhi*, *B. diphtheriae*, *V. cholerae*, *B. pestis*, *B. dysenteriae* Shiga, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. violaceus*.

Michaëlis en *Rona* vonden bovendien nog aanwezigheid van lipase bij *B. tuberculosis*; bij de negatieven voegden zij *B. dysenteriae* Flexner en Y en pneumococcen.

Verder zijn vele schimmels goede lipasevormers (*Orla Jensen*, *Jacobsen*, *Went*).

De *methoden*, welke men aanwendde om deze lipolyse aan te toonen, zijn de volgende:

I. De bacteriën worden gesuspenseerd in physiol. zoutoplossing en dan levend (*Söhngen*) (17) of door toluol gedood. (*Gideon Wells and Corper*) (7), in contact gebracht met het te onderzoeken vet, dat in een vloeibaren voedingsbodem gesuspenseerd is of ze worden geënt op een vasten bodem, waarin men het vet mengt (v. *Somaruga*) (19). Later wordt de, ten opzichte van den niet geënten voedingsbodem veranderde zuur-

graad getitreerd. v. *Somaruga*, aan wien wij het eerste onderzoek over bacterieele lipasen danken, gebruikte olijfolie en rundervet, die met agar of gelatine waren gemengd.

Tegen deze methode zijn bezwaren in het midden gebracht o.a. door *Wlassowa* en *Livschitz* (9): de gevormde zuren kunnen weer verzeept worden, terwijl de zuurgraad ook verandering ondergaan kan door oxydatie zonder lipolyse of door omzetting van andere in den voedingsbodem aanwezige stoffen b.v. koolhydraten. Deze laatste moeilijkheid vervalst, indien men een mineralen voedingsbodem gebruikt, waarin als eenige bron van organisch voedsel vet is toegevoegd, zooals *Söhngen* dit deed.

2a. Door de hydrolyse ontstaan vetzuren en zeepen, welke het vet wit en ondoorzichtig maken. Deze verandering kan men fraai waarnemen in de door *Eijkman* (6) aangegeven *vetplaat*. Hierbij wordt het gesmolten vet in een dunne laag uitgegoten op den bodem van een verwarmde Petrischaal. Na bekoeling en stolling wordt een laag agar op het vet gegoten. De plaat wordt beënt met de te onderzoeken microörganismen en enkele dagen bebroed. Indien een lipase gevormd wordt, ontstaat om de koloniën een witte ondoorzichtige hof in het vet.

Aan deze werkwijze kleeft het bezwaar, dat ze niet bijzonder gevoelig is, zoodat sommige bacteriën, die volgens *Eijkman* de vetlaag onaangetast laten, volgens fijnere, later beschreven methoden lipolytisch blijken te werken (b.v. *V. cholerae*).

b. *Söhngen* (17) plaatste *zuiltjes van vet* in reageerbuizen, waarin een vloeibare voedingsbodem aanwezig was. Na 30 dagen bij 20° C vond hij op de doorsnede der zuiltjes aan den buitenkant een bacterie-huid, daaronder een wit zeepachtig gedeelte, vervolgens een laag bestaande uit vetzuren en eindelijk het onontlede vet.

c. Laatstgenoemde onderzoeker maakte echter gewoonlijk gebruik van de *vetbuisjesmethode*. De binnenzijde van een steriel droog reageerbuisje wordt bekleed met een dun laagje steriel vet; vervolgens wordt de cultuurvloeistof erin gebracht. Indien de geënte bacterie een lipase vormt, wordt dat deel van het vet, dat met den vloeibaren voedingsbodem in aanraking is, wit.

3. De *Kali-methode* van *Harrowitz Wlassowa* en *Livschitz* (9).

Deze emulgeerden soja-olie in een vasten mineralen bodem. Deze ondoorzichtige voedingsbodem, wordt op die plaatsen, waar de geënte bacteriën het vet ontleed hebben, helder bij behandeling met 15 % kaliloog (door vorming van oplosbare K-zeepen uit oleïnezuur); op de overige gedeelten blijft de voedingsbodem troebel.

Deze reactie valt echter, volgens genoemde onderzoekers, alleen positief uit bij krachtige lipasevormers (*B. pyrocyanus*, *B. fluorescens*, *B. prodigiosus*), terwijl ze voor de bestudeering van lipasen, gevormd door schimmels, ongeschikt is.

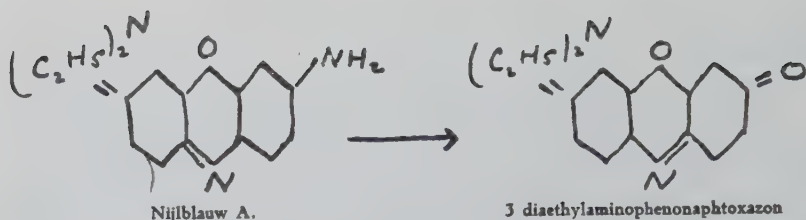
4. De *kopersulfaatmethode*.

Men kan het vet, b.v. boter, emulgeeren in agar, welke in een Petrischaal wordt uitgegoten. De agar wordt beënt en na bebroeding gedurende ongeveer 10 minuten, bedekt met een verzadigde waterige oplossing van CuSO_4 , welke vervolgens afgegoten wordt. De ontlede vetdruppels worden groen gekleurd ten gevolge van de vorming van Cu-zeep. Vooral bij zwakke vergrootting is deze methode zeer demonstratief.

Carnot en *Mauban* (2) gaven deze methode oorspronkelijk aan voor het aantoonen van lipolytische werking van steapsine uit duodenaal en maagsap. *Berry* (1) gebruikte ze om bacterieele lipasen op te sporen. „This method is well adapted to the classroom as well as to the research laboratory.”

5. De *Nijlblauwmethode*.

Lorrain Smith en *Powell White* ontdekten bij behandeling van coupes, dat deze kleurstof eiwit blauw kleurt, maar neutraal vet rood. *Thorpe* (21) onderzocht het chemisme van deze reactie. Hij vond dat nijlblauw en enkele verwante kleurstoffen, welke alle derivaten bleken te zijn van phenonaphtoxazine, over kunnen gaan in rood gekleurde oxazonen. De vrije of gesubstitueerde NH_2 groep wordt hierbij omgezet in een OH groep, terwijl bovendien intramoleculaire atoomverschuiving plaats vindt. De roode kleurstof kan uit de blauwe bereid worden door extractie met xylol.



Zoowel *Turner* (22) als *Collins* en *Hammer* (3 en 4) bestudeerden met behulp van deze reactie de bacterieele lipasen. Het vet wordt gemengd met de agar, waaraan een weinig in water of alcohol opgeloste nijblauw wordt toegevoegd en uitgegoten in een Petrischaal. De vetdruppeltjes zijn rood gekleurd; om de kolonie van de bacterie, welke lipase vormt, ontstaat echter een hof van blauwe druppels, welke hof des te grooter is, naarmate het lipolytisch vermogen sterker is. Volgens laatstgenoemde onderzoekers is deze methode niet voor alle vetten even geschikt; met tricaproïne en tricapryline b.v. was de lipolyse gemakkelijker te beoordeelen aan de verdwijning der vetbolletjes dan aan de kleursverandering.

6. De stalagmetrische methode

danken wij aan *Michaëlis* en *Rona* (15). Tributyrine heeft de eigenschap de oppervlaktespanning van water te verlagen, waardoor het aantal druppels van eenzelfde volumen water, gemeten met den stalagmeter, belangrijk toeneemt. Suspendeert men in water, verzadigd met tributyrine, bacteriën, welke dit vet kunnen splitsen, dan zal de oppervlaktespanning van de vloeistof toenemen en daarmee het aantal druppels kleiner. Bij volkomen omzetting van de tributyrine wordt het gevonden druppelgetal gelijk aan dat van water. Om den invloed van gevormde zuren uit te schakelen, suspendeert men de bacteriën in een buffer, b.v. de door *Sörensen* aangegeven fosphaatbuffer en voegt deze suspensie aan de gefiltreerde, heldere tributyrineoplossing toe.

Deze methode is zeer gevoelig en leent zich in het bijzonder voor het onderzoek van quantitatieve bepaling van de bacterieele lipasen.

7. (De nephelometrische methode)

aangegeven door *Kleinmann* (14), waarbij een trioleïne emul-

sie door het lipase gesplitst wordt en het gesplitste en onge-splitste vet met een nephelometer worden vergeleken, is voor bepaling der bacterieele lipasen niet geschikt. De reactie wordt sterk beïnvloed door de aanwezigheid van electrolyten, zoodat men geen buffer kan toevoegen.

Eigen onderzoek.

Zoowel *Eijkman* (6) als *Michaëlis* en *Rona* (15) vonden lipasewerking bij staphylococcus aureus en albus.

Voor zooverre dit uit hunne mededeeling kan beoordeeld worden, is het door hen onderzochte aantal stammen gering, zoodat het toeval niet uitgesloten kan worden.

Daar men naast staphylococcen, welke haemolyse kunnen veroorzaken, vele andere stammen kan aantreffen, welke dit vermogen missen, achtte ik het niet onwaarschijnlijk dat een dergelijke indeeling ook voor de lipasevorming gevonden zou kunnen worden; indien deze veronderstelling juist mocht blijken te zijn, zou het belangwekkend zijn na te gaan of het vermogen om lipase te vormen hand in hand zou gaan met de haemolytische werking, welke immers in verband gebracht wordt met het ziektemakend vermogen. Dit vermoeden werd eenigszins gesteund door het feit, dat pyogene coccen een voorkeur voor de huid blijken te hebben, waar ze furunkels e.d. veroorzaken; het zou mogelijk kunnen zijn, dat hun vermogen vet aan te tasten, hun den toegang tot dit orgaan zouden vergemakkelijken.

Ik heb daarom de lipasevorming nagegaan:

1. bij staphylococcen gekweekt uit pus (furunkels, abscessen, enz);
2. bij staphylococcen gekweekt uit de lucht, met behulp van agarplaten, welke gedurende eenigen tijd open aan de buitenlucht (meestal buiten, soms binnen de stad) waren blootgesteld;
3. bij staphylococcen gekweekt van de huid van gezonden, die daartoe de vingers drukten op een agarplaat. De meeste onderzochten waren juridische studenten. Teneinde een onge-

²⁾ Dr. A. Grünbaum, die mij nog enkele technische wenken gaf, ben ik hiervoor zeer erkentelijk.

wenschte selectie te voorkomen, heb ik vermeden cursisten of personen, werkzaam in het laboratorium, te onderzoeken.

Voor dit onderzoek koos ik de bij uitstek geschikte stalagmometrische methode. Bij een vorig onderzoek (24) was mij deze werkwijze reeds als zeer bruikbaar bekend; bovendien waren de technische aanwijzingen gegeven door *Hulscher* (11), die een nauwkeurige studie maakten van bloedserumlipasen, mij van groot nut.

Techniek.

Evenals *Hulscher* (11) gebruikte ik den gemodificeerden stalagmometer van *Traube*, waarvan het druppelgetal voor water ± 70 was en voor verzadigde tributyrineoplossing ± 100 .

Het tributyrine (*Schering-Kahlbaum*) werd opgelost in een, met gedestilleerd water 5 maal verdunde fosphaatbuffer volgens *Sörensen* pH 7.4 (volgens *Michaëlis* en *Rona* ligt de optimale pH voor de bacterieele lipolyse tusschen 7,2 en 9) door 2 druppels tributyrine met 50 cc buffer matig snel te schudden gedurende 2 uren. De zwak troebele emulsie werd dan gefiltreerd door vochtig filtreerpapier.

De 24 uur agarculturen werd gesuspenseerd in 5 cc gesteriliseerde fosphaatbuffer (1/5) pH 7.4; zooals *Michaëlis* en *Rona* (15) dit aangeven, werd 2 cc van deze suspensie gebruikt voor de directe bepaling en 2 cc voor de tweede bepaling. Bij elke 2 cc bacteriesuspensie werd daartoe 10 cc verzadigde tributyrineoplossing gevoegd en dit mengsel zoowel direct, als na 6-urig verblijf in de broedstoof van 37° stalagmometrisch onderzocht. Het mengsel werd met behulp van een door middel van een gummislang aan den stalagmometer verbonden glazen buisje opgezogen, nadat het even te voren nog gefiltreerd werd om verstopping van het instrument te voorkomen.

Groote zorg werd besteed aan de reiniging van den stalagmometer; het is toch immers noodzakelijk dat door elk volgend onderzoek elk spoortje tributyrine verwijderd wordt. Daartoe werd het instrument, dadelijk na het gebruik doorgezogen met water en dan minstens 2 uren in chroomzuur geplaatst. Alvorens het opnieuw te gebruiken, werd het eerst van buiten goed afgespoeld, dan 12 maal doorgezogen met water met behulp van een waterstraalluchtpomp), daarna 2 maal met alcohol

96 % en nog 1 maal met absoluten alcohol of aether. Tenslotte werd het gedurende 1 uur in de droogstoof tot 110° verwarmd. Ook alle overige, voor de bepaling noodige glaswerk werd met chroomzuur behandeld en daarna zorgvuldig schoongemaakt.

Aldus werden onderzocht 25 uit pus gekweekte staphylococcen, 21 lucht-staphylococcen en 22 van de normale huid gekweekte staphylococcen. Voor de meeste stammen werd de uitkomst vergeleken met de haemolyse en de plasmastolling, terwijl bovendien de kleurnuance werd genoteerd. De uitkomsten vindt men weergegeven in de tabellen I, II en III.

Teneinde de betekenis der verkregen druppelwaarde vast te leggen, werden de volgende *contrôleproeven* verricht:

TABEL I. Pus-staphylococcen.

No.	Lipolyse			Haemolyse	Plasmastolling	Kleur
	Gevonden druppelverschil	Maximaal druppelverschil stal, meter				
2	31	(34)	+++	+	+	+++
20	34	(34)	+++	±	—	+
23	28	(34)	+++	+++	+	++
25	34	(34)	+++	+++	+	+++
31	31	(34)	+++	+	+	++
38	22	(34)	++	±	+	+
40a	33	(34)	+++	+++	+	++
40b	30.5	(34)	+++	+	+	+++
40c	30.5	(32)	+++	±	+	++
41	30	(34)	+++	±	+	++
47	32	(34)	+++	+++	+	+
48	32.5	(34)	+++	+	+	++
51	30	(31)	+++	++	n. o.	+++
53	31.5	(34)	+++	+++	+	+++
54	32.5	(34)	+++	+++	+	+++
55	29.5	(31)	+++	++	n. o.	+++
61	30	(30)	+++	+++	+	+++
100	29.5	(30)	+++	++	+	+++
101	30	(30)	+++	+++	+	++
103	30	(30)	+++	+++	+	++
105	29.5	(31)	+++	±	+	+++
106	27.5	(30)	+++	±	+	++
108	29.5	(30)	+++	++	n. o.	+++
110	30	(30)	+++	++	n. o.	+++
114	32	(32)	+++	n. o.	n. o.	citreus

TABEL II. Lucht-staphylococcen.

No.	Gevonden druppel- verschil	Lipolyse		Haemo- lyse	Plasma- stolling	Kleur
		Maximaal druppelverschil	stal. meter			
0	2.5	(34)	±	—	—	±
10	2	(34)	±	—	—	citreus
15	2.5	(34)	±	—	—	—
21	4.5	(34)	±	—	—	+
a	6	(34)	+	—	—	+
b	4	(34)	±	±	—	—
c	4.5	(32)	±	—	—	±
d	6.5	(30)	+	—	—	+
e	3.5	(30)	±	—	—	±
f	1.5	(30)	±	±	—	—
g	5	(32)	+	—	—	—
h	28	(30)	+++	—	—	—
j	1.5	(30)	±	—	—	+
k	19.5	(30)	++	—	—	—
l	21.5	(31)	++	—	—	—
m	10.5	(32)	+	—	—	+
n	8.5	(31)	+	—	—	±
o	28.5	(30)	+++	—	—	—
p	15	(32)	++	—	—	—
q	14	(31)	+	±	—	—
r	0.5	(31)	±	n. o.	n. o.	—
s	16.5	(30)	++	n. o.	n. o.	—

TOELICHTING BIJ DE TABELLEN.

In de eerste kolom vindt men het druppelverschil, berekend door het druppelgetal gevonden na 6 uren bij 37°, af te trekken van het druppelgetal, verkregen door bepaling van tributyrine-buffer zonder bacteriën.

In de tweede kolom vindt men tusschen haakjes aangegeven het maximale druppelverschil voor de gebruikte stalagmometer, dus tusschen de druppelgetallen van tributyrine-buffer en buffer.

In de derde kolom is de sterkte de lipolyse aldus uitgedrukt in graden:
druppelverschil 1 — 5 = +

„ 5 — 15 = +

„ 15 — 25 = ++

„ 25 en grooter = +++

De kleur van de staphylococcen erd bepaald door een oogje van de agar culturen op een voorwerpglas met witten achtergrond te brengen en onderling te vergelijken.

(wit = —; zeer licht geel = +; licht geel = ++; donkerder geel = +++;
goudgeel +++)

TABEL III. Huid-staphylococcen.

No.	Gevonden druppel- verschil	Lipolyse		Haemo- lyse	Plasma- stolling	Kleur
		Maximaal druppelverschil	stal. meter			
H. 1	3	(34)	±	—	—	+
H. 2	17	(32)	++	—	—	—
H. 3	8.5	(30)	+	—	—	—
H. 4	7	(30)	+	±	—	—
H. 4a	23.5	(31)	++	—	—	++
H. 6	13.5	(30)	+	±	—	—
H. 7	9	(30)	+	±	—	±
H. 8	30	(30)	+++	+	+	++
H. 9	30	(30)	+++	—	—	+
H. 10	11	(32)	+	—	—	±
H. 10a	29.5	(31)	+++	++	+	+++
H. 12	7.5	(32)	+	—	—	+
H. 13	28.5(9)	(31)	+++ (+)	—	—	—
H. 15	23.5	(30)	++	—	—	+
H. 16	30.5	(32)	+++	+++	+	+
H. 18	21	(31)	++	—	—	+
H. 20	3.5	(36)	±	—	—	—
H. 20a	30	(30)	+++	+++	+	+++
H. 21	5.5	(30)	+	—	—	—
H. 32	5.5	(31)	+	n. o.	n. o.	—
H. 32a	30	(31)	+++	n. o.	n. o.	++

1. Voor het onderzoek van de staphylococcen werden 5 stalagmometers gebruikt, waarvan de druppelgetallen voor verzadigde tributyrine, resp. voor water de volgende waren:

St. *) I 102. —69. ; druppelverschil 33.

„ II 99.5—68.5; druppelverschil 31.

„ III 98.5—68.5; druppelverschil 30.

„ IV 99.5—69.5; druppelverschil 30.

„ V 102. —68. ; druppelverschil 34.

2. Vergelijkende tellingen werden gedaan bij de temperatuur van de kamer en bij die van de in het laboratorium aanwezige tropische kamer.

Verzadigde tributyrine opl. St. I: 19°—102.5 druppels.

„ I: 26°—102. „

Gedestilleerd water „ II: 19°— 68.5 „

„ II: 24°— 69. „

*) St. = stalagmometer.

Deze en andere bepalingen toonden bij genoemde temperaturen slechts kleine verschillen, hoogstens van 2 druppels aan. Daar de temperatuurschommelingen in de kamer, waar de proeven genomen waren, veel geringer waren, kon ik afzien van het aanbrengen van een mantel om de stalagmometer om de temperaturen constant te houden. Bovendien bleek, dat de verschillen in uitkomsten bij de krachtig en bij de zwak lipolytisch werkende coccen zoo duidelijk zijn, dat een verschil van een paar druppels practisch geen beteekenis zou hebben.

3. De invloed van de toevoeging van den buffer aan het water, is althans in de verdunning, die gebruikt wordt, nul; zooals dit trouwens door *Michaëlis* en *Rona* wordt aangegeven.

St. II: Gedestilleerd water: 19°—68.5.

Buffer 7.4 (1/5): 19°—68.5.

4. De verzadigde tributyrineoplossing, waaraan geen bacteriën zijn toegevoegd, ondergaat geen verandering van oppervlaktespanning bij een verblijf gedurende 6 uren in de broedstoof van 37°.

St. III: verzadigde tributyrine opl., direct 98.5.

„ „ „ , na 6 uren bij 37° 98.

St. IV: verzadigde tributyrine opl., direct 99.5.

„ „ „ , na 6 uren bij 37° 99.5.

5. Staphylococcen gesuspenseerd in den fosphaatbuffer 1/5, wijzigen hiervan de oppervlaktespanning niet.

St. III: buffer 1/5 pH 7.4 21° : 68.5.

id. + susp. staph. 47 (na filtr.) 21° : 68.5.

St. IV: buffer 1/5 pH 7.4 21° : 69.

id. + susp. staph. 47 (na filtr.) 21.5° : 69.5.

6. Hierbij werden de druppelwaarden berekend, wanneer de in den buffer gesuspenseerde staphylococcen gelegenheid hadden om gedurende 5 of 10 minuten bij kamertemperatuur op de toegevoegde tributyrineoplossing in te werken, alvorens het mengsel in den stalagmometer werd gezogen.

St. I: staph. aur. n° 61: direct 18° : 99.

na 5 min. 19° : 95.

na 10 min. 19° : 92.5.

staph. aur. n° 100: direct 18° : 97.5.

na 5 min. 19° : 93.

na 10 min. 19° : 92.

St. II: staph. aur. n° 55:	direct	20°	: 98.5.
	na 5 min.	19°	: 99.5.
	na 10 min.	19.5°	: 99.
St. III: staph. albus l.	: direct	19°	: 98.5.
	na 5 min.	19°	: 99.
	na 10 min.	19.5°	: 99.
St. IV: staph. aur. H. 32a:	direct	19.5°	: 93.5.
	na 5 min.	19°	: 92.
	na 10 min.	19.5°	: 88.

Hieruit blijkt dat sommige staphylococcen (61, 100 en H. 32a) zoo krachtig lipolytisch werken, dat ze reeds na 5 minuten bij kamertemperatuur een verandering van de oppervlakte-spanning veroorzaken. Daar de menging van de suspensie met de tributyrine, de filtratie, het opzuigen en het tellen eenige minuten vragen, is het waarschijnlijk, dat sterk actieve coccen reeds in deze korte periode een deel van de tributyrine splitsen. Dit vermoeden wordt bevestigd als men ziet, dat de druppel-waarde, verkregen bij directe telling van doorgelopen vloeistof bij staphylococcen 61, 100 en H. 32a kleiner zijn dan de waarden, welke men met het tributyrine-buffermengsel zonder coccen kreeg.

Ik heb daarom het eindresultaat berekend door het, na inwerking van de bacteriën gedurende 6 uren bij 37° — wanneer de splitsing van het tributyrine practisch afgeloopen is — verkregen druppelgetal af te trekken van de, voor elken stalagmometer bekende waarde voor het tributyrine-buffer-mengsel; ter vergelijking heb ik daarom in de tabellen de maximale druppelverschillen tusschen tributyrine en water, tusschen haakjes, naast het in de proef gevonden druppelverschil geplaatst. Dit komt mij, gezien het resultaat van deze reeks waarnemingen, juist voor, dan de bij directe en bij de latere telling gevonden waarden van elkaar af te trekken, zooals *Michaëlis* en *Rona* doen.

7. Verder werd de tributyrinesplitsing bij een vijftal actieve coccen nagegaan, na 1, 3, 5 en 6 uur bij 37°. Het blijkt dat na 6 uur de ontleding practisch tot stand is gekomen. Een inwerkingsduur van 3 uur, zooals *Michaëlis* en *Rona* voorschrijven, is niet altijd voldoende.

8. In deze curven werden de verkregen druppelgetallen

omgerekend in percentages van de gesplitste tributyrine. Deze werden gevonden, door voor elken stalagmometer eerst de druppelgetallen te bepalen, welke overeen kwamen met de, in bepaalde verhoudingen met fosphaatbuffer gemengde, tributyrineoplossing.

Voor ik gelegenheid had deze percentage-bepalingen te verrichten, brak een der stalagmometers. Deze was gebruikt voor het onderzoek van een deel der staphylococcen. Omdat het dus niet mogelijk was, het resultaat van alle onderzochte stammen in percentages uit te drukken, — wat wenschelijk ware geweest — heb ik me bepaald tot het aangeven van het druppelverschil, welke vergeleken met het telkens aangegeven maximale druppelverschil van den stalagmometer, een voldoende inzicht geeft in de uiteenlopende activiteit der stammen. Het bleek n.l. dat de druppelverschillen, welke men verkrijgt als men eenzelfde stam met meer dan een stalagmometer onderzoekt, weinig uiteenloopen:

- Staph. aureus H. 31a: Druppelverschil met
 St. I: 32. ; S. II: 30.5; S. III: 30. ; S. IV: 30.
 Staph. aureus n° 51: Druppelverschil met
 St. I: 32. ; S. II: 30. ; S. III: 29.5; S. IV: 29.5.
 Staph. albus H. 32: Druppelverschil met
 St. I: 5.5; S. II: 5.5; S. III: 3.5; S. IV: 4.5.
 Staph. albus I. : Druppelverschil met
 St. I: n.o. ; S. II: 21.5; S. III: 21.5; S. IV: 21.5.

Bespreking der uitkomsten.

Het blijkt dat alle 25 uit pus gekweekte staphylococcen aureusstammen krachtig lipolytisch werkten; 7 ontleedden de tributyrine voor 100 %. Van een verband met de meer of minder sterke haemolyse bespeurt men niets. Goed komt dit tot uiting bij stam 40, die behalve haemolytische, (40a) ook zwak haemolytische varianten (40b en 40c) afsplitste, die alle krachtig lipolytisch werkten.

De 22 uit de lucht gekweekte staphylococcen waren voor het meerendeel wit, de minderheid licht geel van kleur; eenmaal werd staphylococcus citreus geïsoleerd. Geen enkele stam stolde plasma; 16 waren zwakke lipasevormers; de overige 22, alle wit van kleur, vertoonden echter een sterke tot zeer sterke reactie.

Het blijkt dus niet mogelijk te zijn, de pyococcen van de saprophyten te onderscheiden door onderzoek van hun lipolytisch vermogen.

Van 21 *huidstammen* werkten 10 zwak en 11 sterk lipolytisch. Van deze laatste stolden 4 het plasma, terwijl ook de haemolyse meer of minder krachtig was.

Hoewel ik voor dit onderzoek personen gekozen had, waarvan men verwachten kon, dat ze niet met purulent materiaal in aanraking kwamen, vond ik toch enkele malen naast een meerderheid van witte koloniën, in de vingerafdrukken koloniën van *staphylococcen aureus*.

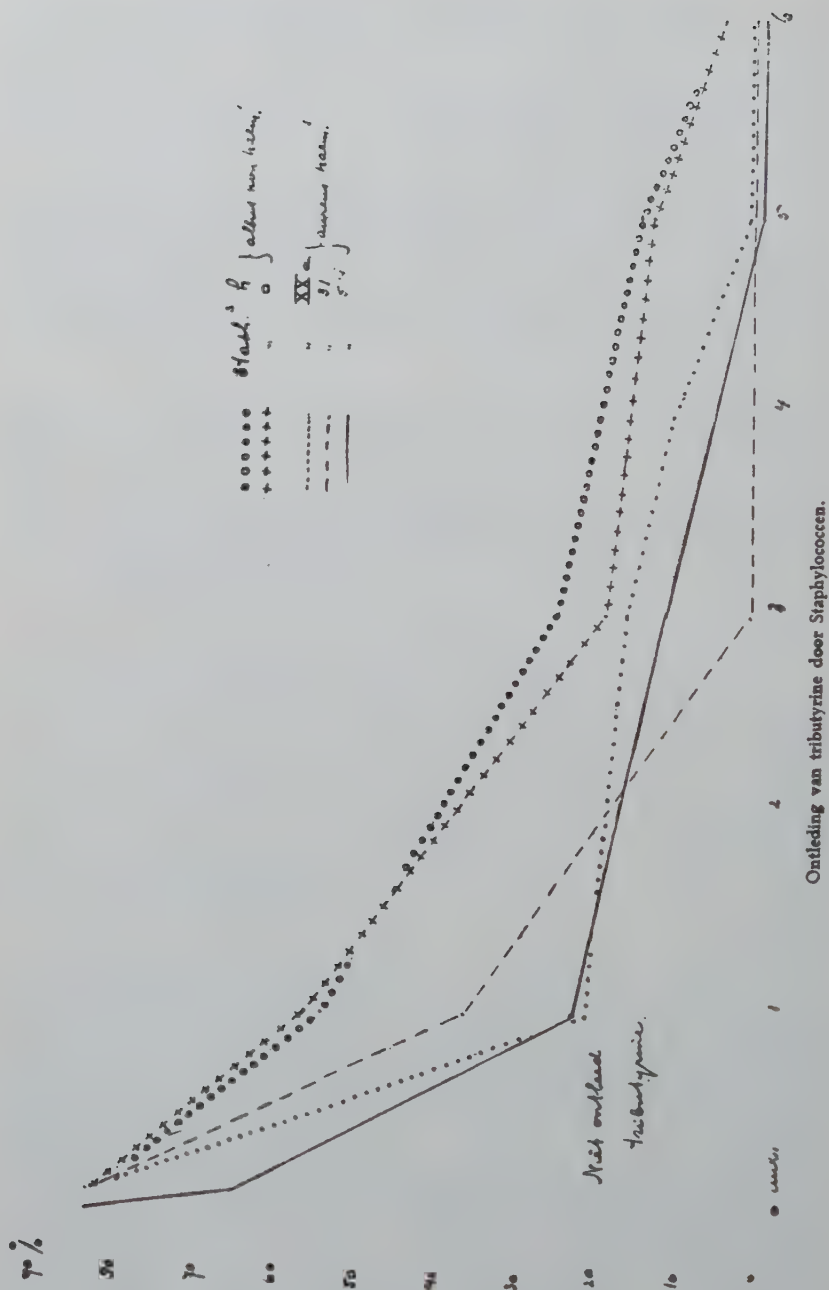
Andere onderzoekers vonden op de normale huid naast overwegend *staph. albus* in een kleine minderheid der gevallen *staph. aureus*. *Goldschmidt* (8) kweekte in 12 gevallen slechts 1 maal *staph. aureus*; Yap i Sian (25) vond bij *acne vulgaris* op 169 *staph* stammen 13 \times *staph. aureus*, waarvan 3 stammen haemolytisch waren en plasma stolden. *Hiemcke* (10) vond geen onderscheid in de flora van de normale huid en die bij *acne vulgaris*.

Deze onderzoeken betroffen echter andere deelen van de huid dan die van de vingers.

Zoo werden de *staphylococcus albus* H. 10 en de *Staph. aureus* H. 10a van eenzelfde persoon verkregen en evenzoo de *staph. albus* H. 20 en de *Staph. aureus* H. 20a. Merkwaardig is het nu, dat ik juist bij deze coccen een typisch verschil vond. De *Staph. aureus haemolyticus* H. 10a en H. 20a werkten krachtig lipolytisch; de *staph. albus non haemolyticus* H. 10 en H. 20 zwak. Allicht zou men geneigd zijn hieruit te concludeeren, dat er toch wel eenig verband tusschen de lipolyse en de haemolyse bestaat.

Neuberg en *Reicher* (16) (tevens verwijzende naar vorige onderzoeken van *Neuberg* en *Rosenberg*) vonden dat de haemolytisch werkende bijen- en slangengiften in staat waren olijfolie, ricineolie en lecithine te splitsen (titratiemethode); hetzelfde gold voor cholera en *staphylococcen* haemolysinen. Omgekeerd vonden ze, dat maag- en pancreaslipasen haemolyse veroorzaakten. Het gelukte hun niet de stoffen, welke deze omzettingen veroorzaakten, te scheiden. Zij wijzen op het aantrekkelijke van de voorstelling, dat de haemolyse veroorzaakt of ingeleid zou kunnen worden door de lipasen, wanneer deze de lipoidlaag der roode bloedlichaampjes zouden aantasten.

Het zou mogelijk zijn, dat *staphylococcen*, die — zooals men het met laboratoriumstammen zoo vaak waarneemt — het



vermogen om te haemolyseeren hebben verloren, hun lipolytische werking behouden.

Voor zoover ik gelegenheid had mijn stammen na eenige weken of maanden weer te onderzoeken, vond ik steeds nageoeg dezelfde waarde van het lipolytisch vermogen. Slechts stam H. 13 (staph. albus) vormde op dezen regel een uitzondering; oorspronkelijk krachtig werkzaam, was hij later zwak positief geworden. Hoewel het aantal waarnemingen te gering was om tot een zekere conclusie te komen, kreeg ik den indruk, dat de staphylococcen en in het bijzonder staphylococcus aureus, ook bij overenting, het lipolytisch vermogen quantitatief behouden.

Tenslotte heb ik nog getracht van enkele zwak werkende stammen het lipolytisch vermogen te versterken. De stammen 7, 9, 10, 15 en 21 werden daartoe gedurende 4—5 maanden vrijwel dagelijks overgeënt op agar, waarin tributyrine gesuspenseerd was. (5 druppels op 100 cc.) Het resultaat was negatief.

Het quantitatief verloop van de lipolyse.

Uit de bovenstaande uiteenzettingen is gebleken dat, hoewel de meeste saprophytische staphylococcen zwak lipolytisch werken, er toch zoovele uitzonderingen voorkomen, dat het niet mogelijk is met behulp van den stalagmometer uit te maken of een staphylococcus, welke in het laboratorium uit ingezonden materiaal wordt gekweekt, als pathogeen moet worden beschouwd; althans niet met èèn enkele bepaling.

Daarom heb ik nog nagegaan of misschien het quantitative verloop van de lipasereactie bij de actieve witte, niet haemolytische staphylococcen anders zou zijn dan bij de pyococcen. Daartoe werd de tributyrinesplitsing nagegaan na 1, 3, 5 en 6 uren bij 37° en wel bij de witte coccen h en o (beide uit de lucht gekweekt) en de pyococcen 20a (huid), 31 en 51 (pus). In dit geval werden, zooals reeds eerder werd vermeld, de uitkomsten omgerekend in percentages. Uit de curven blijkt dat hoewel bij alle coccen de lipolyse het krachtigst was gedurende de eerste 2 uren (zooals ook *Michaëlis* en *Rona* vonden) de reactie bij de saprophyten h en o geleidelijker verliep dan bij de pyococcen. (Zie bijgaande curven.)

Thermostabilität.

Söhngen (18) onderscheidt thermotolerante lipasen, die zonder ontleding 100° C gedurende 5 minuten verdragen en thermolabele, die al bij 80° C ontleed worden, b.v. die van *B. fluorescens*, *aspergillus niger* e.a. *Michaëlis* en *Rona* vonden dat bij de meeste van de door hen onderzochte bacteriën, verhitting gedurende 10 minuten bij 100° C niet voldoende was om het lipase geheel te vernielen. In het bijzonder was dit het geval bij *staphylococcus albus*, waar na 10 minuten koken het lipase de tributyrine nog van 80—21 % splitste; (zonder verhitting van 80—2 %) bij *staphylococcus aureus* waren deze getallen 80—54 % na verhitting en 80—4 % zonder verhitting.

Wellicht zou het dus nog mogelijk zijn de lipasen der actieve saprophytische en pyococcen op deze wijze te onderscheiden.

Bij de eerste twee, daarop onderzochte pyococcen vond ik eveneens een thermostabiliteit bij verhitting op 100° C gedurende 10 minuten. De gelegenheid ontbrak echter het onderzoek in deze richting over een groot aantal stammen uit te breiden.

SAMENVATTING.

(Mitteilungen aus dem bakteriolog.-hygienischen Laboratorium der Reichsuniversität Leiden.)

Ueber das Fettspaltungsvermögen von Staphylokokken.

Verf. bespricht die verschiedenen Methoden, die für die Untersuchung bakterieller Lipasen Verwendung finden, und berichtet über die Resultate, die er bei Anwendung der von *Michaëlis* und *Rona* angegebenen stalagmometrischen Bestimmung bei Tributyrinspaltung erhalten hat. Er untersuchte ausschließlich *Staphylokokken* (aus Eiter, aus der Luft, von der normalen Haut), die zu diesem Zweck in 2 ccm Phosphatpufferlösung (pH = 7,4) suspendiert wurden, die mit 4 Teilen Aq. dest. verdünnt waren. Hierzu wurden 10 ccm gesättigte Tributyrin-Pufferlösung gefügt. Darauf wurde die Zahl der Tropfen nach 6 Stunden Bebrütung bei 37° mit der Tropfenzahl der gewöhnlichen Tributyrin-Pufferlösung verglichen.

Es stellte sich heraus, dass alle 25 aus Eiter gezüchteten *Staphylococcus aureus*-Stämme kräftig lipolytisch wirkten, von

ihnen bauten 7 Tributyrin zu 100 % ab. Ein Zusammenhang mit der Hämolysestärke (Hammelblut-Bouillon) war nicht eindeutig. Ein Stamm spaltete schwachhämolytische Varianten ab, die nicht weniger stark lipolytisch waren.

22 aus der Luft gezüchtete Staphylokokkenstämme waren grösstenteils weiss, einige leicht gelb. Einmal wurde *Staphylococcus citreus* isoliert. Nur 3 Stämme wirkten schwach hämolytisch, und kein einziger Stamm zeigte eine positive Plasma-Koagulations-Reaktion. 16 Stämme waren sehr schwach lipolytisch, 6 Stämme (alles *Staphylococcus albus non haemolyticus*) indessen stark.

Es ergab sich somit, dass eine ganze Anzahl saprophytische Staphylokokken nur sehr wenig Lipase bildeten, doch kamen so viele Ausnahmen vor, dass es im Allgemeinen nicht möglich war, die Pyokokken von den Saprophyten mittels Untersuchung der lipolytischen Fähigkeit zu differenzieren.

Weitere 22 Stämme wurden von der normalen Haut durch Fingerabdrücke auf Agarplatten isoliert. Von ihnen waren 10 schwach, die übrigen stark lipolytisch. Die untersuchten Personen, meist Rechtsstudierende, kamen nicht mit purulentem Material in Berührung, doch wurden neben einer Mehrzahl von weissen Kolonien mitunter auch Kolonien von *Staphylococcus aureus* angetroffen. Bei 2 Personen war der isolierte *Staphylococcus albus non haemolyticus* ein schwacher Lipasebildner, während der *Staphylococcus aureus haemolyticus* von der gleichen Haut kräftig lipolytisch wirkte. Hieraus zeigt sich also ein gewisser Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, Hämolyse und Lipasen zu bilden.

Verf. versuchte bei 5 Stämmen von *Staphylococcus albus* die schwache Lipasebildung dadurch zu verstärken, dass 4—5 Monate lang täglich Passagen auf Agar durchgeführt wurden, der emulgiertes Tributyrin enthielt. Eine Verstärkung glückte indessen nicht.

Schliesslich untersuchte Verf. den quantitativen Verlauf der Tributyrinspaltung bei 2 aktiven Stämmen von *Staphylococcus albus* und 3 Pyokokken. Es ergab sich, dass bei den Saprophyten die Reaktion langsamer verlief. Es fehlte an Zeit, die Thermostabilität der Lipase zu untersuchen. (*Michaëlis* und *Rona* fanden, dass diese bei *Staphylococcus aureus* und aktiven Stämmen von *Staphylococcus albus* verschieden ist.)

On the lipolytic action of staphylococci.

Dr. N. VAN DER WALLE.

Communication from the bact. laboratory of the Leiden university.

The writer discusses the various methods used in investigating bacterial lipases and gives the results which he himself obtained with the help of Michaëlis and Rona's stalagmometric determination of the tributyrin lysis. The writer investigates exclusively staphylococci (cultures of which were made from pus, from the air and from normal skin), for which 2/5 agar cultures were suspended in 2 c.c. phosphate buffer, p.H. 7.4, which was diluted with 4 parts of distilled water: to this 10 c.c. saturated tributyrin buffer solution was added, and the number of drops after standing 6 hours at 37° C was compared with the number of drops of the unaltered tributyrin buffer mixture.

It appeared that all the 25 staphylococcus aureus varieties of which the cultures had been made from pus, had a strong lipolytic action; 7 reduced the tributyrin for 100 %. The connection with the degree of haemolysis was not clear. One kind separated weakly haemolytic varieties, which were not less strongly lipolytic.

22 kinds of staphylococcus taken from the air were mostly white, some were light yellow; once a staphylococcus citreus was isolated.

Only 3 kinds had a very weak haemolytic action and none was found giving a positive plasma coagulation reaction. 16 kinds were very weakly lipolytic, 6 kinds (all staph. non-haemolyticus) were very strongly lipolytic.

It appeared therefore that a large number of saprophytic staphylococci formed only a very small amount of lipase; yet so many exceptions were found that it was not possible to distinguish the pyococci from the saprophytes by an examination of their lipolytic action.

21 various stocks were reared from the normal skin, from finger impressions on agar plates; 10 were weakly, the rest strongly lipolytic. The persons from whom they were taken were chiefly law students, who did not come into contact with purulent material. And yet along with a majority of white colonies, some colonies of staphylococcus aureus were met with.

Of the cultures made from two of the persons there were isolated staphylococcus albus cultures which proved to be weak lipase formers, while the staphylococcus aureus haemolyticus cultivated from the same skin showed strong lipolytic action.

Hence it seemed that there was some connection between haemolysin and lipase production.

The writer tried to increase the weak lipase forming power in 5 kinds of staphylococcus albus, by reinoculating them daily on agar to which tributyrin had been added, in which he did not succeed.

Lastly he examined the qualitative tributyrin splitting power of 2 active staphylococci albi, and 3 pyococci; it appeared that the reaction took place slower with the saprophytes.

Lack of time prevented him from examining the thermostability of the lipases, which according to Michaelis and Rona is different in white and yellow staphylococci.

LITERATUUR-OPGAVEN.

- (1) *Berry, J. A.*, Detection of microbial lipase by coppersoap formation. *J. Bact.* 25 (1933), p. 433.
- (2) *Carnot, P. et Mauban, H.*, Réaction colorée de la stéapsine sur plaques de gélose graisse émulsionnée par production de savon de cuivre. *C. R. Soc. de Biol.* 81 (1918), p. 98.
- (3) *Collins, M. A. and Hammer, B. W.*, The action of certain bacteria on some simple triglycerides and natural fats as shown by Nile-blue sulphate. *J. path. and bact.* 27 (1934), p. 473.
- (4) *Collins, M. A. and Hammer, B. W.*, Types of lipolysis brought about by bacteria as shown by Nile-blue sulphate. *J. path. and bact.* 27 (1934), p. 487.
- (5) *Derx*, Oxydatieve afbraak van vetten door schimmels. *Versl. Kon. Acad. v. Wet. Amsterdam* 33 (1924), p. 545.
- (6) *Eijkman, C.*, Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *C. f. B. Or.* 29 (1901), p. 841.
- (7) *Gideon Wells, H. and Corper, H. J.*, The lipase of bac. tuberculosis and other bacteria. *J. inf. dis.* 2, (1912), p. 388.
- (8) *Goldschmidt, W. N.*, Die Staphylococcen bei Acne Vulgaris. *Arch. f. D. und S.* 149, (1925), p. 575.
- (9) *Harowitz Wlassowa, L. M. and Livschitz, M. J.*, Zur Frage der Wirkung der Microben auf Fette. *C. f. B. II.* (1935), p. 424.
- (10) *Hiemcke, H. J. Th.*, Bijdrage tot de kennis der impetigo vulgaris en verwante aandoeningen. *Diss. A'dam.* 1933.
- (11) *Hulscher, W. C. J. B.*, Lipase in het bloedserum, enz. *Diss. A'dam.* 1935.
- (12) *Jacobsen, H. C.*, Researches on and means to prevent rancidity of vegetable margarine. *Folia microbiol.* 5, (1919), p. 94.

- (13) *Jensen, Orla*, Studien über das Ranzig werden der Butter. C. f. B. II. 8, 1902, p. 11 e.v.
- (14) *Kleinmann, H.* in *Oppenheimer, Pincussen*, die Methodik der Fermente, p. 726.
- (15) *Michaelis, L. und Nakahara, Y.*, Die fettsplattenden Fermente der Bakterien. Z. f. Imm. 36, (1923), p. 449.
- (16) *Neuberg, C. und Reicher, K.*, Lipolyse, Agglutination und Haemolyse. Mü. m. W. 1907, p. 1725.
- (17) *Söhngen, N. L.*, Vetsplittings door bakterien. Versl. Kon. Ac. v. Wet. 19, (1910), p. 689.
- (18) *Söhngen, N. L.*, Thermotolerante lipasen Jb. 20, (1911), p. 126.
- (19) *Somaruga, E. v.*, Ueber Stoffwechselprod. v. Microorganismen. Z. f. Hyg. u. Inf. 17, (1894), p. 44.
- (20) *Stokoe, J.* Soc. of chem. ind. 40, (1921), p. 75. (Geref. door *Derx.*).
- (21) *Thorpe, J.*, A reaction of certain colouring matters of the ozazine-series. J. of the Chem. Soc. London. 91, (1907), p. 324.
- (22) *Turner, R. H.*, A differential plating medium for lipase producing bacteria. Proc. Soc. f. exp. biol. a med. 25, (1927), p. 318.
- (23) *Waldschmidt-Leitz, E.*, in *Oppenheimer-Pincussen*, die Methodik der Fermente. p. 700.
- (24) *Van der Walle, N.*, Ueber synthetische wirkung bacterieller Lipasen. C. f. B. 70, (1927), p. 369.
- (25) *Yap I Sian*, Over acne vulgaris en verwante aandoeningen. Diss. A'dam. 1936.

Het Schema-1935 van het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid voor het bacteriologische Onderzoek van Drinkwater

DOOR

Dr. J. W. DE WAAL.

In 1931 werd in overleg tusschen den Directeur van het Centraal Laboratorium en de pharmaceutische Inspectie van de Volksgezondheid voor het bacteriologische onderzoek van drinkwater een schema vastgesteld, aanmerkelijk afwijkende van het tot dien tijd in het genoemde laboratorium gebruikelijke. Dit laatste is opgenomen in Meerburg en Massink (1933). Het Schema-1931 werd slechts toegepast op watermonsters, onderzocht ten behoeve van de aangegeven Inspectie. Het was samengesteld zooals hierna is vermeld.

Schema-1931. 1. Glucosevergiftiging bij 45° C; 2. Lactosevergiftiging bij 45° C; 3. Lactosevergiftiging bij 37° C, alle drie met 2×25 cm³; 2×10 cm³ en 2×1 cm³ water. Tevens werd verricht 4. Onderzoek op streptococcen in 5 cm³; 1 cm³ en 0.1 cm³ water. De bepaling van het aantal kiemen op gelatine en agar, ook in het schema opgenomen, wordt nu niet besproken.

Daar het Centraal Laboratorium rekening diende te houden met de beschikbare werkkraft, werd afgesproken het bacteriologische onderzoek van een monster water als geëindigd te beschouwen bij een negatieven uitslag van de proeven onder 1—4 genoemd; in dit geval was het water zuiver te achten. Ook zou van verder onderzoek worden afgezien, indien glucose of lactose bij 45° C werden vergist; het positieve verloop dezer reacties kon gelden als bewijs voor een faecale verontreiniging. Dezelfde gevolgtrekking zou worden gemaakt bij het voor-

komen van streptococcen. Indien echter uitsluitend gisting werd verkregen in de lactose-vloeistof bij 37° C, dan zou worden getracht één of meer colistammen uit de gisting vertoonende buizen zuiver te kweken ten einde deze zoo mogelijk als faecale coli te indentificeeren. Van faecalen oorsprong was dan met zekerheid aan te merken een stam, verkregen door het afenten van een voor coli typische kolonie op een Endo-plaat, welke glucose en lactose onder zuur- en gasvorming kan ontleden, zoowel bij 37° C, als bij 45° C, indologeën is en Gram-negatief.

De toepassing van het hiervoor beschreven schema had ten doel na te gaan, welke waarde de onder 1—4 genoemde proeven bezitten voor het aantoonen van faecale verontreiniging van water. Tot het verkrijgen van een juiste vergelijking werd voor elk van de gistingsproeven uitgegaan van gelijke hoeveelheden water, op eenzelfde wijze verdeeld. Aan deze voorwaarde werd door het gebruikelijke schema van het Centraal Laboratorium niet voldaan. Het onderzoek op streptococcen kon op grond van technische bezwaren in het genoemde laboratorium niet worden verricht met de hoeveelheden water voor de gistingsproeven gebruikt; het werd op den ouden voet voortgezet, ook wat betreft de methodiek. De gistingsproeven werden verricht met de hierna beschreven oplossingen.

Vloeistof voor glucosevergisting bij 45° C, *a* enkelvoudig: 1.0 % pepton-Witte; 0.5 % Na-chloride; 0.5 % glucose en 2.5 % lakmoesoplossing-Kahlbaum; *b* drievoudig: een oplossing drie-maal zoo sterk als *a*.

Vloeistof voor lactosevergisting bij 45° C en 37° C, *c* enkelvoudig en *d* drievoudig: de samenstelling van *c* en *d* is gelijk aan die van *a* en *b*, met dien verstande, dat glucose wordt vervangen door lactose.

De vloeistoffen worden bedeeld met zooveel van het te onderzoeken water, dat mengsels worden verkregen met nage-noeg 1.0 % pepton-Witte.

Op de hiervoor beschreven wijze werden in den loop van ongeveer drie jaren onderzocht 296 monsters drinkwater. Het grootste deel hiervan was afkomstig uit z.g. welputten, de rest uit regenwaterbakken. De uitslag van het onderzoek der monsters wordt weergegeven in de hierna volgende tabel.

TABEL I.

Monsters.

1. Glucose- vergisting bij 45° C.	+	62	5		21	19	7	10	
2. Lactose- vergisting bij 45° C.	+	36	2		19		10	3	2
3. Lactose- vergisting bij 37° C.	+	278		165	21	19	7	10	3 2 51
4. Streptococcen	+	81			11		7	10	2 51

De eerste verticale cijferkolom geeft aan hoeveel monsters positief waren ten opzichte van één der vier proeven: + 62 betekent dus, dat 62 monsters bij 45° C gisting veroorzaakten in de glucoseoplossing en zoo vervolgens. De tweede verticale cijferkolom zegt, dat 5 monsters de glucosvergisting bij 45° C als eenige bacteriologische fout vertoonden. De negende kolom, dat 10 monsters ten opzichte van de vier proeven positief waren. De inrichting der tabel zal na deze toelichting wel duidelijk zijn.

Gistingen.

In 5 gevallen is de zuur- en gasvorming uit glucose bij 45° C de eenige bacteriologische fout van het monster. Dit heeft waarschijnlijk geen vertegenwoordigers bevat van de coli-aerogenesgroep; het uitblijven van de lactosevergisting bij 37° C duidt in die richting. Wel is de aanwezigheid van thermotolerante paracoli's mogelijk geweest. Deze organismen, welke geen lactose kunnen vergisten, zijn niet te rekenen tot de hiervoor genoemde groep.

In 2 gevallen veroorzaakte het monster zuur- en gasvorming uit lactose, eveneens bij 45° C, terwijl de vergisting dezer suiker bij 37° C achterwege bleef. Ook bij deze beide monsters is het voorkomen van coli's of aerobacters weinig waarschijnlijk.

In $21 + 7 = 28$ gevallen komt de glucosevergisting bij 45° C voor met de lactosevergisting bij 37° C, maar zonder de lactosevergisting bij 45° C. Neemt men aan, dat stammen behorende tot de coli-aerogenesgroep door een passage van het darmkanaal van een warmbloedige thermotolerant kunnen worden

ten opzichte van glucose en lactose, dan is het ontbreken van de lactosevergisting bij 45° C voor de 28 monsters in bespreking als volgt te verklaren. Deze monsters zijn oorspronkelijk verontreinigd met stammen, welke beide suikers bij 45° C konden vergisten. Echter hebben deze het vermogen tot het ontleden van lactose bij de aangegeven temperatuur, als gevolg van het verblijf in het water, sneller verloren dan dat ten opzichte van glucose.

In tegenstelling met de 28 hiervoor besproken monsters veroorzaakten $3 + 2 = 5$ andere geen vergisting van glucose bij 45° C, maar wel die van lactose bij deze temperatuur en tevens bij 37° C. Hier is dus de thermotolerantie ten opzichte van glucose sneller gedaald dan die voor lactose. Deze mogelijkheid is reeds eerder waargenomen. (De Waal 1918.)

Van 165 monsters is de eenige bacteriologische fout de vergisting van lactose bij 37° C; zie hierover onder Stammen.

Streptococcen.

Deze werden aangetroffen in 81 monsters en bij 11 hiervan vormde het voorkomen dezer organismen de eenige bacteriologische fout. In 51 gevallen bevatten de monsters streptococcen en konden zij lactose vergisten bij 37° C, maar zij waren niet in staat deze suiker of glucose te vergisten bij 45° C. Hieruit blijkt, dat de streptococcen uit verontreinigd water volstrekt niet altijd eerder verdwijnen dan de thermotolerante vertegenwoordigers van de coli-aerogenesgroep. Deze gangbare opvatting wordt ook daardoor weersproken, dat van de 296 onderzochte monsters in 81 streptococcen voorkwamen, terwijl slechts 69 in staat bleken glucose, of lactose bij 45° C te vergisten. Deze cijfers krijgen nog meer betekenis, indien in aanmerking wordt genomen, dat voor het onderzoek op streptococcen slechts 6.1 cm³ water in bewerking wordt genomen. Werden hiervoor, evenals voor de gistingsproeven bij 45° C, 72 cm³ water onderzocht, dan zou het voorkomen van streptococcen nog aanmerkelijk meer frequent blijken. Hier zij gewezen op een uiting van Peeters (1929), die op grond van eenige waarnemingen aan regenwater twijfelt aan het „min of meer algemeen aanvaarde axioma, dat streptococcen spoedig uit het water verdwijnen”.

Stammen.

Uit de Mc Conkey-buizen van de monsters, welke vergisting van lactose bij 37° C als eenige bacteriologische fout vertoonden, werden met behulp van Endo-platen 161 stammen zuiver gekweekt en nader onderzocht op de in Tabel II vermelde eigenschappen. Van te voren was vastgesteld, dat alle stammen Gram-negatief waren. Tevens was bij een voorafgaand onderzoek gebleken, dat 14 van de 161 geïsoleerde stammen niet in staat waren glucose bij 37° C onder zuur- en gasvorming te ontleden. Van deze 14 stammen vormden weder 7 wel indol; deze laatste 7 zijn vermeld in Tabel II. De 14 afwijkende stammen behooren niet tot de coli-aerogenesgroep.

TABEL II.

Stammen.

Glucose- vergisting bij 45° C.	+	9	1	1				7
Lactose- vergisting bij 45° C.	+	13			1	5	7	
Lactose- vergisting bij 37° C.	+	147	1	1	1	5	7	80 52
Indolvorming	+	100		1		5	7	80 7

Na de toelichting bij Tabel I zal de inrichting van Tabel II wel zonder meer duidelijk zijn.

Zooals uit de tabel blijkt, vertoonen 147 stammen de lactose-vergisting bij 37° C. Thermotolerant zijn 15 stammen; 2 hiervan vergisten alléén glucose, 6 alléén lactose bij 45° C, terwijl 7 de beide suikers bij de aangegeven temperatuur ontleden. Deze cijfers bevestigen de opmerking reeds bij de bespreking van de eigenschappen der monsters onder Gistingen gemaakt. Stammen, welke thermotolerant zijn ten opzichte van glucose of lactose, verliezen deze eigenschap bij hun voortbestaan in water. Echter verdwijnt niet steeds de thermotolerantie ten opzichte van lactose het eerst, integendeel. Evenwel is ook de volgende opvatting mogelijk. De stammen verliezen hun thermotolerantie in betrekking tot de beide suikers even snel, of zelfs iets sneller ten opzichte van lactose, maar herwinnen de eigenschap voor de laatstgenoemde suiker toch eerder, als een

gevolg van het kweken op lactosehoudende voedingsbodems; zie Söhngen en Coolhaas (1922), die een voorbeeld geven van een dergelijke aanpassing van eert gist voor galactose. Toch geldt deze laatste wijze van verklaren weer niet voor de 2 gevallen, waarbij de thermotolerantie voor glucose alléén voorkomt, noch voor de 7 gevallen, waarin de vergisting van glucose en die van lactose geen verschillen vertoonen.

Volgens het hiervoor beschreven onderzoek van 296 monsters water zouden 81 daarvan dienen te worden afgekeurd, daar zij streptococcen bevatten. Het voorkomen van deze organismen wordt geacht een zeer recente faecale verontreiniging aan te geven. Op grond van de gistingsproeven bij 45° C zouden slechts 69 monsters hetzelfde oordeel verdienen. Deze numerieke verhoudingen doen zeker twijfel ontstaan aan de waarde van gistingsproeven bij 45° C, genomen met watermonsters, tot het opsporen van faecale verontreiniging. Eijkman (1913) heeft reeds gewezen op de geringe zekerheid, welke negatieve uitkomsten, ook bij zijn proef, geven. Maar toch is er aanleiding tot het maken van de hierna volgende opmerkingen.

De vraag doet zich voor bij de onderzoekingen in bespreking, welke betekenis moet worden gehecht aan een negatief resultaat der gistingsproeven bij 45° C. De onderzochte 296 monsters waren afkomstig uit alle deelen van Nederland. Zij werden na de bemonstering zoo spoedig mogelijk naar het Centraal Laboratorium te Utrecht verzonden, maar dit transport vorderde in den regel toch meerdere uren. Er zullen wel gevallen zijn geweest, dat tusschen de monsternamen en den aanvang van het onderzoek in het laboratorium een twintigtal uren waren verstreken. Nu is het bekend, dat bij het bewaren van water, en dit geschiedt bij het transporteeren van een monster, het vermogen daarvan tot het vergisten van glucose bij 45° C terugloopt, m.a.w., dat de Eijkman-titer omhoog gaat. Voor lactose zal wel hetzelfde gelden. Men kan dus ook zeggen, dat de thermotoleranten-titer hooger wordt bij het bewaren van water. Hoe groot die stijging is na één, of twee, of meerdere uren, of dagen, hieromtrent zijn slechts weinige gegevens gevonden.

De Graaff (1932) nam waar, dat bij het bewaren van watermonsters de aanvankelijk gevonden Eijkman-titer van 1 cm³ reeds na drie dagen was gestegen tot 10 cm³ en na zeven dagen

tot 100 cm³. De herkomst van het water wordt niet vermeld. Ook deelt dezelfde onderzoeker t.a.p. mede: „Werd in den beginne een lactosetiter bij 37° C van 1.0 cm³ gevonden en was het Eijkman-titer 10 cm³, dan bleek, na één week, het lactosetiter nog constant, het Eijkman-titer tot 50 cm³ gedaald; na één maand vertoonde ook het lactosetiter een verandering en wel waren toen 20 cm³ van het water noodig, om in zuren lactosebouillon bij 37° C. gisting te veroorzaken, terwijl zelfs met 100 cm³ water geen positieve Eijkman-proef meer kon worden opgewekt”.

Schaeffer (1935) doet mededeelingen over het stijgen van den Eijkman-titer bij het bewaren van water. Hij neemt echter zijn proeven met oppervlaktewater en vermeldt de verhooging van den titer na het bewaren gedurende 2, 4 of 7 dagen en langer. Ook bezaten de monsters bij het scheppen zeer lage thermotoleranten-titers, welke snel kunnen stijgen. Geheel anders zijn de verhoudingen bij het transport binnen 24 uren van put-, regen-, of leidingwater. Deze veroorzaken in het meerendeel der gevallen geen vergisting bij 45° C, indien de gebruikelijke hoeveelheden water voor het onderzoek worden aangewend, b.v. die van het Schema-1931. Ook indien met deze hoeveelheden nog wel vergistingen bij de aangegeven temperatuur worden verkregen, ligt de titer toch meestal hoog, zoodat daarin door het transport weinig verandering is te verwachten; gegevens hieromtrent zijn echter niet gevonden. Een onderzoek naar den invloed van het transport van watermonsters op de gistingstiters zou zeker zijn nut hebben. Dit geldt vooral voor monsters uit z.g.n. welputten, gelegen in verschillende streken van Nederland en dus in verschillende grondsoorten. Een dergelijke nasporing is ter sprake geweest bij het hernieuwde overleg tusschen het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid en de pharmaceutische Inspectie bij het beëindigen van de proefneming met Schema-1931, maar de omstandigheden verhinderden een onderzoek in de aangegeven richting. Alvorens het resultaat mede te deelen van het zoo even vermelde overleg, zij ter voorkoming van misverstand, het volgende opgemerkt.

In deze mededeeling wordt een gistingstiter hoog genoemd, indien een groote hoeveelheid water noodig is ten einde vergisting van een der gebruikelijke suikers te verkrijgen en laag,

zoo een geringe hoeveelheid water daarvoor voldoende is. De Graaff — zie hiervoor — gebruikt de beide aanduidingen in omgekeerden zin.

Het hernieuwde overleg, hiervoor bedoeld, leidde tot het Schema-1935, hetwelk in den vervolge voor het bacteriologische onderzoek van drinkwater in het Rijks Instituut te Utrecht zal worden toegepast; het volgt hierna.

Schema-1935.

- A. Het vooronderzoek der monsters op „coli” zal geschieden volgens Mc Conkey bij 37° C met $2 \times 25 \text{ cm}^3$, $2 \times 10 \text{ cm}^3$ en $2 \times 1 \text{ cm}^3$ water.
- B. Het onderzoek ter bevestiging van de aanwezigheid van „coli” zal geschieden met behulp van:
 - 1e. de Endo-plaat,
 - 2e. de lactosevergisting bij 45° C,
 - 3e. de indolreactie,
 - 4e. de Gram-kleuring.
 De bevestigingen onder 3e en 4e genoemd, kunnen kortheidshalve desnoods achterwege blijven, indien de lactosevergisting bij 45 ° C positief is.
- C. Het onderzoek op streptococcen zal geschieden, zooals tot nu toe gebruikelijk is. Zie Meerburg en Massink.
- D. De bepaling van het aantal kiemen op gelatine en agar is zonder wijziging gehandhaafd. Zie Meerburg en Massink.

Bovendien werd nog overeengekomen de reactie positief te achten, indien slechts één der duplo-bepalingen onder A genoemd, positief zou zijn. Voor de hoeveelheid gas bij deze gistingsproeven in een buis verkregen, zal geen bepaalde grens worden gesteld, waaronder de reactie negatief moet worden genoemd. Voor de proeven genoemd onder A en B, 2e, wordt gebruikt de lactose-vloeistof aangegeven onder Schema-1931.

Bij beschouwing van het Schema-1935 blijkt dit routine-onderzoek met het oog op de kosten aan tijd en materiaal zoo eenvoudig mogelijk te zijn gehouden. Toch werd het voldoende geacht voor de bacteriologische beoordeling van water uit individuele voorzieningen en voor steekproeven bij waterleidingen. Noch de proef van Eijkman, noch de lactosevergisting bij 45° C wordt als voorproef toegepast. De laatstgenoemde

vergisting is wel ter sprake geweest. Echter is overwogen, dat bij het onderzoek der 296 monsters van Tabel I, slechts 69 in staat bleken glucose of lactose bij 45° C te vergisten. Het onderzoek van alle monsters, welke bij het Instituut binnen komen op hun vermogen glucose te vergisten bij 45° C, zou hoogstens in 20 % der gevallen eenige meerdere inlichting kunnen verschaffen omtrent het onderzochte water. Dit percentage zou bij het gebruik van lactose in plaats van glucose ongeveer 12 zijn. Deze resultaten werden te gering geacht als vergoeding voor alle kosten en moeite aan het verkrijgen daarvan verbonden. Deze zienswijze was te eerder aanvaardbaar, omdat een nader onderzoek naar de stammen in de gistende Mc Conkey-buizen toch in de bedoeling lag. Met deze beslissing is dus op praktische, meer dan op theoretische gronden afgeweken van den door vele Nederlandsche waterbacteriologen gevolgden gang van onderzoek, waartoe de proef van Eijkman wel behoort. Het Schema-1935 sluit in dit opzicht aan bij de Amerikanen en Engelschen. De bevestiging van de aanwezigheid van „coli's” zal geschieden zooals onder B in het schema is aangegeven. De aandacht wordt gevestigd op de beteekenis, welke wordt gehecht aan het vermogen van een zuiver gekweekten stam tot het vergisten van lactose bij 45° C.

Tegen het onderzoek op „coli's”, zooals dit onder A en B is aangegeven, zullen sommige deskundigen in Nederland bezwaren hebben. Zij, o.a. Smit (1932), zijn van oordeel, dat „volledige” coli's, defect geworden door een meer of minder langdurig verblijf in water, wellicht bij de bemonstering daarvan niet meer thermotolerant zijn geweest, waarbij dan wordt gedacht aan een temperatuur van 45° C. De voorproeven met lactose bevattende vloeistoffen, het overbrengen op een Endoplaat en het nogmaals kweken in een lactoseoplossing, alles bij 37° C, zouden echter de defecte coli's hun thermotolerantie doen herwinnen. Het gevolg hiervan is dan een onjuiste beoordeeling van het onderzochte water. Ten onrechte zou worden aangenomen, dat reeds in het monster thermotolerante stammen aanwezig waren, wat weder voert tot de onjuiste gevolgtrekking van een recente faecale verontreiniging. Tegen deze zienswijze kan voorloopig het volgende worden ingebracht.

Grijs (1921) heeft de meening uitgesproken, dat „echte” coli in het darmkanaal van warmbloedigen het vermogen krijgt

glucose te vergisten bij 46° C, terwijl de verkregen eigenschap langzamerhand weer verloren gaat als de thermotolerant geworden stammen hun bestaan in water, of in den bodem moeten voortzetten. Wat „echte” coli moet worden geacht, wordt door Grijs niet nader omschreven, maar de bedoeling is toch wel deze, dat „echte” coli is die, welke bij daarvoor gunstige omstandigheden thermotolerant wordt. Ook spreekt de mededeeling alleen over glucose maar voor lactose zal een overeenkomstige veronderstelling mogen gelden. Wellicht staat de zaak zóó, dat door het verblijf in het darmkanaal van den warmbloedige voor „echte” coli verschillende levensuitingen bij 45° C mogelijk worden.

Maar, indien onder „echte” coli wordt verstaan wat hiervoor is omschreven, dan zullen daartoe óók dienen te worden gerekend de *Aerobacters*. Na de onderzoekingen van Krugers Dagneaux (1930; 1934), Mom en Lecluse-Asselbergs (1932) en Schaeffer (1935), moet worden aangenomen, dat ook *Aerobacter* stammen thermotolerant kunnen worden en deze eigenschap weer kunnen verliezen, zoowel ten opzichte van lactose als van glucose. Dit komen en gaan der thermotolerantie onder invloed van het milieu, is te beschouwen als een modificatie met nawerking, zooals deze is beschreven in Baur (1930). Deze karakteristiek der eigenschap in bespreking, sluit erfelijkheid uit en doet haar kennen als phaenotypisch. Zoo gezien, kan men genotypische verschillen tusschen *B. coli commune* en *B. lactis aerogenes* (*Escherichia* en *Aerobacter*) in hun waarde laten en komt men tevens tegemoet aan degenen, die de z.g.n. atypische coli's zien als waarschijnlijk geheel andersoortige organismen dan *bacterium coli commune*. Zie hierover De Graaff (1932). Hier worde ook gewezen op de beschouwingen van Mom en Lecluse-Asselbergs, t.a.p. Deze onderzoekers noemen de afwijkende vormen mutanten van het typische *B. coli commune* en het komen en gaan van de thermotolerantie: muteeren. Dit is in overeenstemming met Beijerinck (1912) en sluit erfelijkheid in. Van Loghem (1930) denkt echter aan modificatie. Hij beschouwt een kloon, de verzameling van de afstammelingen van één bacterie, ook als stam aangeduid, als één individu, waarvan de afzonderlijke bacteriën de cellen zijn. De kloon kan zich nu aanpassen aan bepaalde omstandigheden, blijkende uit het verlies, of het verkrijgen van een eigenschap. Echter vordert

deze aanpassing een zekeren tijd, d.w.z. een aantal celdeelingen in den kloon. Hierdoor wordt de waargenomen nawerking dan aannemelijk gemaakt als een verschijnsel, dat met erfelijkheid niet te maken heeft.

Is bij het komen en gaan der thermotolerantie werkelijk sprake van modificatie met nawerking, welke zoowel kan voorkomen bij *Escherichia* als bij *Aerobacter*, dus bij de geheele coli-aerogenesgroep, dan is voor het onderzoek van water op faecale verontreiniging met behulp der coli-techniek, wel in de eerste plaats aangewezen het aantoonen van thermotolerante stammen, of van stammen, welke gemakkelijk bij het isoleeren met behulp van Endo-platen en lactoseoplossingen bij 37° C hun thermotolerantie herwinnen. Het doet er dan niet meer toe, of deze stammen behooren tot een soort: *B. coli commune*, of dat zij tot de soort *B. lactis aerogenes* moeten worden gerekend. Zij zijn in den zin van Grijns „echte coli”. Wanneer nu deze stammen, na in het darmkanaal van een warmbloedige thermotolerant te zijn geworden, deze eigenschap weder verliezen bij het voortbestaan in het water, of in den bodem, dan zal dit verlies niet plotseling zijn. „Plotseling” te nemen in dien zin, dat het vermogen de beide reeds meer genoemde suikers te kunnen vergisten, zou verdwijnen op zeer korten termijn — hoe kort? —, niet alléén bij 45° C, maar voor elke temperatuur boven 37° C. Bij dezen laatsten warmtegraad schijnt het vermogen van de bacteriën der coli-aerogenesgroep tot het vergisten van lactose en vooral van glucose langen tijd stand te houden, ook in water. Echter zoo eenvoudig als dit hiervóór werd voorgesteld, ligt het geval niet.

Na het verliezen der thermotolerantie voor 45° (tht. 45) zal de stam nog in staat zijn gistingen te veroorzaken bij 44° C (tht. 44) en zoo vervolgens bij dalende temperaturen, waarbij nog eenig verschil kan bestaan tusschen de afzonderlijke bacteriën van den kloon. Deze kan dan wederom door kweken bij 37° C, zooals het Schema-1931 en dat van 1935 dit voorschrijven, weder (tht. 45) worden. Echter gaat dit niet even gemakkelijk in alle gevallen, zooals uit Tabel II blijkt. Slechts 15 van de 147 geïsoleerde stammen worden ten slotte (tht. 45) bevonden. Misschien zijn zij dit reeds geweest bij hun bestaan in het water; wie zal dit uitmaken. Echter bleek in ieder geval, dat de stimuleerende werking, welke een onderzoek volgens

Schema-1931 kan geven, onvoldoende is voor 90 % der stammen tot het verkrijgen, of herkrijgen van (tht. 45). De verklaring ligt voor de hand, dat de 15 reeds aangegeven stammen nog slechts korten tijd geleden uit het darmkanaal in water waren overgegaan, zoodat zij wel hun thermotolerantie voor 45° C hadden verloren, maar nog waren (tht. 44) of (tht. 43), met als gevolg het herwinnen der (tht. 45) na enkele kweekingen bij 37° C. De 132 der geïsoleerde stammen, waarbij dit niet het geval was, bezaten in het watermonster misschien een (tht. 40), of nog lager, met het gevolg, dat zij meerdere celdelingen moesten volbrengen, vaker dienden te worden overgeënt, dus meer tijd noodig hadden dan de 15 stammen om de (tht. 45) weder te bereiken.

Neemt men het voorgaande in aanmerking, dan blijkt het bezwaar van Smit, e.a. slechts te bestaan voor een deel der geïsoleerde stammen. Bij die van Tabel II voor hoogstens 10 %, hoogstens omdat hiervan een kleiner of grooter deel reeds tijdens het verblijf in het water (tht. 45) kan zijn geweest. Maar gezien deze numerieke verhoudingen komt de vraag naar voren, of het bezwaar in bespreking, dat in de eerste plaats van bacteriologischen aard is, ook hygiënische beteekenis heeft.

Mom, c.s. achten het inzicht van Smit, c.s. niet aannemelijk. Volgens hun meening is het niet bewezen, dat de pathogenen steeds uit faecaal verontreinigd water verdwenen zullen zijn vóórdat de Eijkman-titer en de lactose- 37° C-titer beteekend uiteen gaan. En zij zijn van oordeel, dat bij het routine-onderzoek van het water de eisch mag worden gesteld van de afwezigheid van de geheele coli-aerogenesgroep in 100 cm^3 water, „die men gebruikelijkerwijze onderzoekt”. Uit hetgeen daarna volgt, blijken zij vooral te hebben gedacht aan centrale drinkwatervoorzieningen en, wat het voorkomen van typhusbacillen betreft, vooral aan oppervlaktewater. Deze inzichten kunnen worden gedeeld, onder opmerking dat voor het onderzoek op de coli-aerogenesgroep in den regel geen 100 cm^3 water wordt gebruikt. Schema-1935 gebruikt 72 cm^3 .

Wat betreft het afsterven van typhusbacillen in water, dit geschiedt volgens gegevens uit de literatuur aanvankelijk snel. Het meerendeel schijnt na een dag of drie wel verdwenen te zijn. Echter kan een gering, maar nog gevaarlijk aantal gedurende eenige weken in leven blijven. Deze mededeelingen

hebben in hoofdzaak betrekking op oppervlaktewater. Niet onwaarschijnlijk zijn de omstandigheden voor den typhusbacil in de laatstgenoemde watersoort minder gunstig dan in het water uit welputten. Bedenkt men hierbij de waarneming van De Graaff, die een aanvankelijk Eijkman-titer van 1 cm^3 na 3 dagen zag stijgen tot 10 cm^3 en na 7 dagen tot 100 cm^3 , dan valt men Mom, c.s. bij in hun twijfel ten opzichte van het verdwenen zijn van pathogenen vóórdat de Eijkman-titer aanmerkelijk omhoog loopt.

De Graaff acht de vraag naar den ouderdom eener faecale verontreiniging van minder beteekenis, daar ook uit een verontreiniging van ouderen datum de mogelijkheid blijkt van ongewenschte toevloeiingen naar den put, welke zich in de toekomst kunnen herhalen. Deze opvatting moet geheel juist worden geacht en wel in de eerste plaats voor z.g.n. welputten, of ondiepe nortonputten. Deze individueele middelen van drinkwatervoorziening zijn voor groote deelen van Nederland van buitengewoon belang. De gemeentelijke Bouwverordeningen bevatten daarover bepalingen, welke, enkele uitzonderingen daargelaten, het volgende voorschrift bevatten: „Elke woning moet voorzien zijn van een middel tot watervoorziening, dat deugdelijk drink- en huishoudwater in voldoende mate verschaft”. Op grond van de overwegingen, welke haar deden kiezen, moet de aanduiding „deugdelijk” in dien zin worden verstaan, dat het water op verschillende tijden onderzocht, een goede hoedanigheid blijkt te bezitten. Men heeft dit ook wel zóó uitgedrukt, dat het water deugdelijk en betrouwbaar moet zijn, maar in het wezen der zaak vordert men die betrouwbaarheid eigenlijk van het middel van watervoorziening. Aan de genoemde eischen kan slechts een put voldoen — de regenwatervoorzieningen blijven hier korthedshalve buiten beschouwing —, welke door ligging en constructie voldoende waarborgen biedt tegen verontreinigingen. Het vaststellen hiervan vordert een onderzoek ter plaatse. Hierbij worden behalve de put ook betrokken de naaste omgeving daarvan en de geologie en de hydrologie van de streek. Kennis van deze beide laatstgenoemde gegevens is o.m. noodig voor een juiste interpretatie van de scheikundige analyse van het water.

De locale inspectie, en deze is dan op te vatten in den volledigen zin, welke hiervoor is aangegeven, blijft de hoofdzaak

bij de beoordeeling van een middel van watervoorziening. Het onderzoek van het water is daarvan een aanvulling. Ook zonder dit laatste moeten vele putten reeds op grond van fouten in hun ligging of bouw worden afgekeurd. In andere gevallen is het onderzoek van het water in het laboratorium noodig. Hierbij dient te worden bedacht, dat de samenstelling van het water uit welputten en ondiepe nortonputten weinig constant is. Deze wisselt met de hoeveelheid atmosferischen neerslag in een zeker tijdsverloop. Hier is samenhang met den stand van den grondwaterspiegel (phreatisch oppervlak). De verschillen hierin kunnen soms aanmerkelijk zijn en reeds als gevolg daarvan krijgt het putwater een gewijzigde samenstelling. Ook is bij lage grondwaterstanden de kans groot op de toevloeiing van zakwater uit de onmiddellijke omgeving van den put, vooral indien deze sterk wordt aangesproken; zie Bunte (1918); Steg-gewentz (1936) en Spitta u. Reichle (1924).

Uit het voorgaande volgt wel, dat ook een put, welke om technische gebreken niet onmiddellijk behoeft te worden afgekeurd, toch door een enkel onderzoek van het water niet afdoende kan worden beoordeeld. Herhaalde contrôle zal een gunstig resultaat dienen te bevestigen. Heeft het water een ongunstige samenstelling, zonder dat toevallige omstandigheden in het spel zijn, dan is een enkel onderzoek voldoende ter afkeuring.

Op verschillende tijden kan aldus een put water bevatten van zeer ongelijke hoedanigheid, óók ten gevolge van het toevloeiën van faecaal verontreinigd zakwater. Deze behoeft niet voortdurend plaats te vinden, maar kan ook intermitterend zijn. Aan deze omstandigheid dient het bacteriologische onderzoek van het water te worden aangepast. Het moet de zuiverheid van het water bij onderzoek aantoonen door het negatieve verloop der toegepaste proeven en door een positieven uitslag daarvan de verontreinigingen, met name die van faecalen oorsprong, zoowel de recente als de min of meer verouderde. Aan deze voorwaarden voldoet het Schema-1935. Recente verontreinigingen worden aangetoond door de aanwezigheid van streptococcen en waarschijnlijk is het voorkomen van deze organismen een meer betrouwbare aanduiding in de aangegeven richting, dan de proef van Eijkman. Deze laatste geeft een negatief resultaat, ook bij de aanwezigheid van faecale veront-

reiniging en afgezien van andere oorzaken, welke bij deze proef tot een onjuiste uitkomst kunnen leiden, indien het onderzochte water geen gisting meer kan veroorzaken met de gewoonlijk voor dit onderzoek gebruikte hoeveelheden bij 45° C, maar nog wel bij 44° C. Een dergelijke nog recent te noemen faecale verontreiniging, wordt dan niet meer aangetoond. In een dergelijk geval zullen de streptococci nog wel niet verdwenen zijn; zie Tabel I en de toelichting daarbij. Ten opzichte van het onderzoek op streptococci is het te hopen, dat het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid over niet te langen tijd de gelegenheid zal hebben dit onderzoek te verrichten in hoeveelheden water, welke aanmerkelijk grooter zijn dan de tot heden daarvoor gebruikte, bij voorkeur in dezelfde hoeveelheden als die voor de gistingsproeven aangewend.

Neemt men de voorgaande beschouwingen in aanmerking dan kan worden gezegd, dat het Schema-1935 de proef van Eijkman niet toepast, noch een andere gistingsproef bij 45° C, als voorproef bij het onderzoek van een monster water, op grond van financiële overwegingen. Echter blijkt, indien nader op de vraag wordt ingegaan, dat ook op wetenschappelijke gronden het niet gebruiken der aangegeven voorproeven geheel verantwoord is.

De niet meer geheel recente toevloeiingen toont de proef van Mc Conkey aan, zooals deze wordt aangevuld door het zuiver kweken van enkele stammen van de coli-aerogenesgroep, welke óók worden onderzocht op hun vermogen lactose te doen vergisten bij 45° C.

Ten slotte duiden de niet-thermotolerante lactosevergifters op een verontreiniging, welke reeds langeren tijd geleden tot stand kwam.

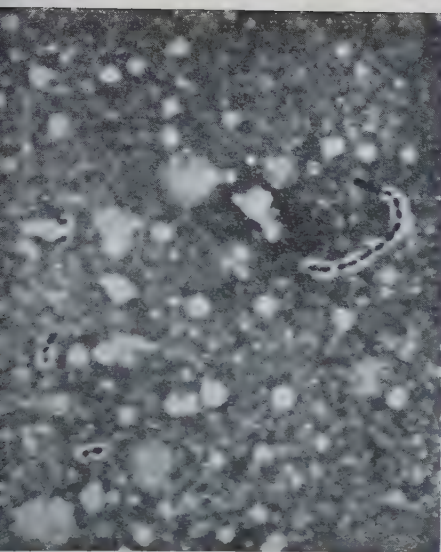
Bij de bespreking van het Schema-1935 zijn, ter vermindering van herhalingen, slechts behandeld in bijzonderheden, de z.g.n. welputten, echter is het schema ook te gebruiken voor regenwatervoorzieningen en voor steekproeven bij waterleidingen. Reeds eerder werd hierop gewezen.

Samenvatting.

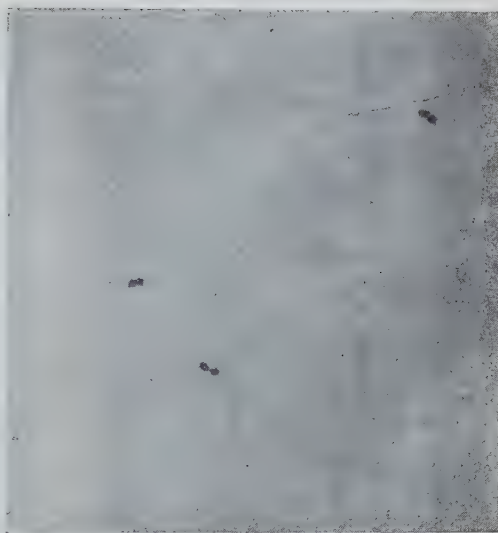
Besproken werd het Schema-1935 voor het bacteriologische routine-onderzoek van drinkwater, zooals dit nu in gebruik is bij het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, met de overwegingen, welke daaraan ten grondslag liggen.

LITERATUUR.

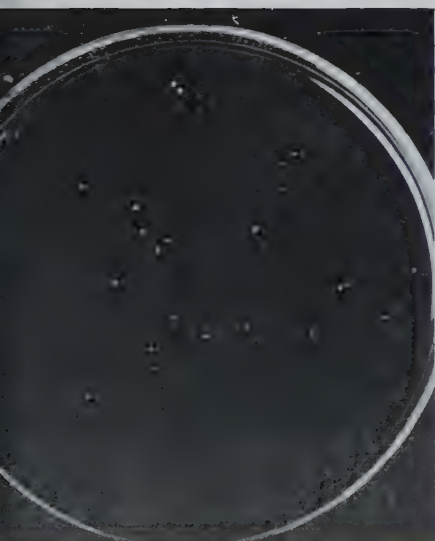
- Meerburg en Massink (1933); Methodiek voor Chemisch en Bacteriologisch Drinkwateronderzoek, blz. 79 e.v.
- De Waal (1918); Het water in de Neder-Betuwe, Diss., blz. 98.
- Peeters (1929); Militair hygiënische verkenningproblemen, Diss., blz. 58.
- Söhngen en Coolhaas (1922); De vergisting van galactose door *Saccharomyces cerevisiae*; Tijdschrift v. vergelijkende Geneesk., enz. Deel IX, Afl. 1 en 2.
- Eijkman (1913); De gistingsproef bij 46° als hulpmiddel bij het wateronderzoek, 2e Mededeeling; Tijdschr. v. Geneesk., Tweede helft, no. 13.
- De Graaff (1932); Bacteriologisch drinkwateronderzoek; Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Ser., Dl. VI, 1932, blz. 52.
- Schaeffer (1935); Over de verspreiding van saccharosevergiftende colibacteriën en hun gedrag tijdens de zelfreiniging van water, Diss., blz. 41 e.v.
- Smit (1932); De moeilijkheden van het bacteriologische drinkwateronderzoek Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Ser., Dl. VI, blz. 19.
- Krugers Dagneaux (1930); Bijdrage tot de kennis der atypische colibacteriën, Diss., blz. 92.
- Grijns (1921); Die Fähigkeit, Glukose bei 46° zu vergären, als erworbene Eigenschaft; Centralbl. f. Bakt., Originale, Bd. 86, Erste Abt. 1921, blz. 173.
- Krugers Dagneaux (1935); Over de waarde van eenige voedingsmedia als opsporingsvloei-stof voor *Bacterium Coli* uit consumptie-ijs; Antonie van Leeuwenhoek. Dl. I, 1934, blz. 292.
- Mom en Lecluse-Asselbergs (1932); *Bacterium coli* als faecaal-indicator; Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Ser., 1932, Dl. VI, blz. 183 e.v.
- Baur (1930); Einführung in die Vererbungstheorie, Vorlesung IV.
- Beijerinck (1912); Mutation bei Mikroben; Verzamelde Geschriften, Vijfde deel, blz. 25.
- Van Loghem (1930); De individualiteitstheorie der bacterieele veranderlijkheid; Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Ser., Dl. IV, 1930, blz. 32.
- Bunte (1918); Das Wasser, blz. 563.
- Steggenwentz (1936); Water, 1936, blz. 95.
- Spitta u. Reichle (1924); Wasserversorgung, 1924, blz. 81 e.v.



Afb. 1.



Afb. 2.



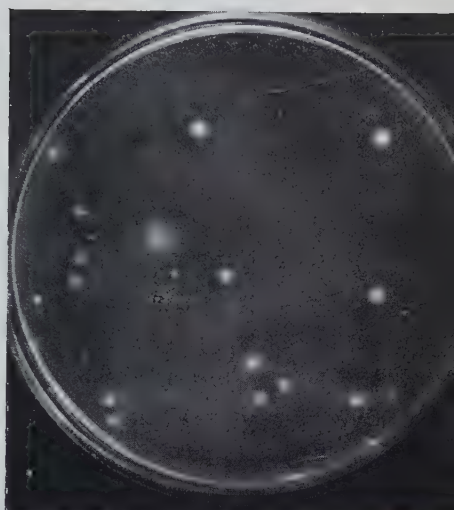
Afb. 3.



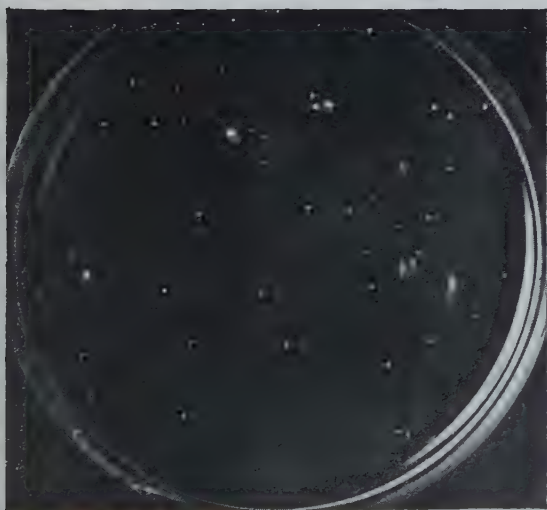
Afb. 4.



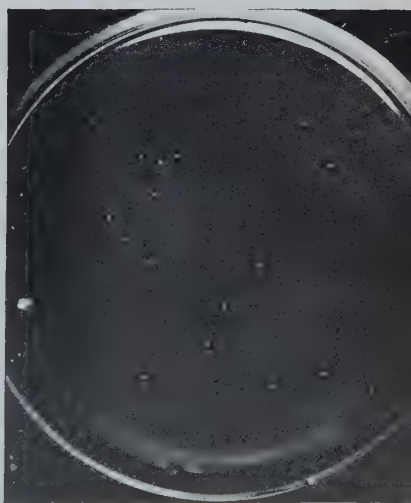
Afb. 5.



Afb. 6.



Afb. 7.



Afb. 8.



Foto 1. Fractioneerkolf met zijbuis.

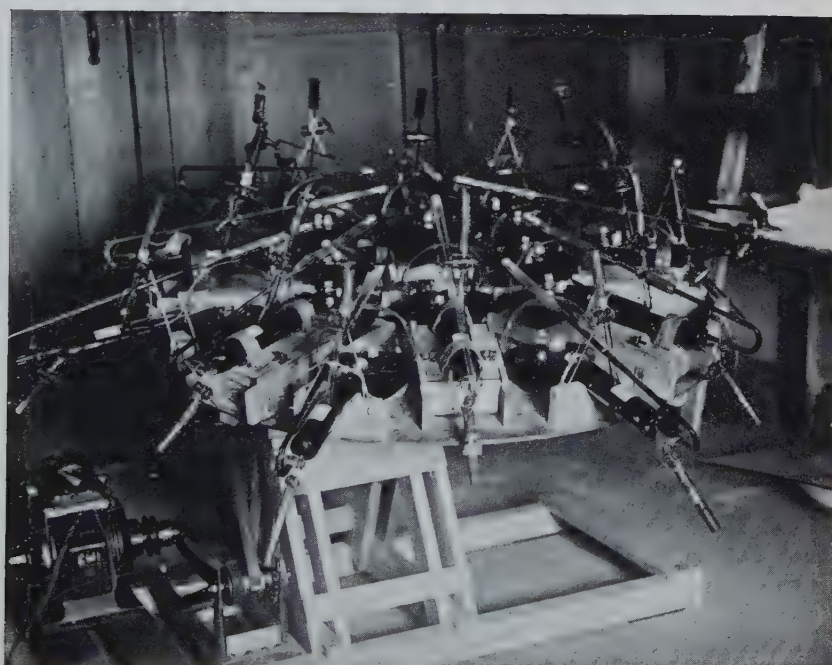


Foto 2.

GRAFIK I.

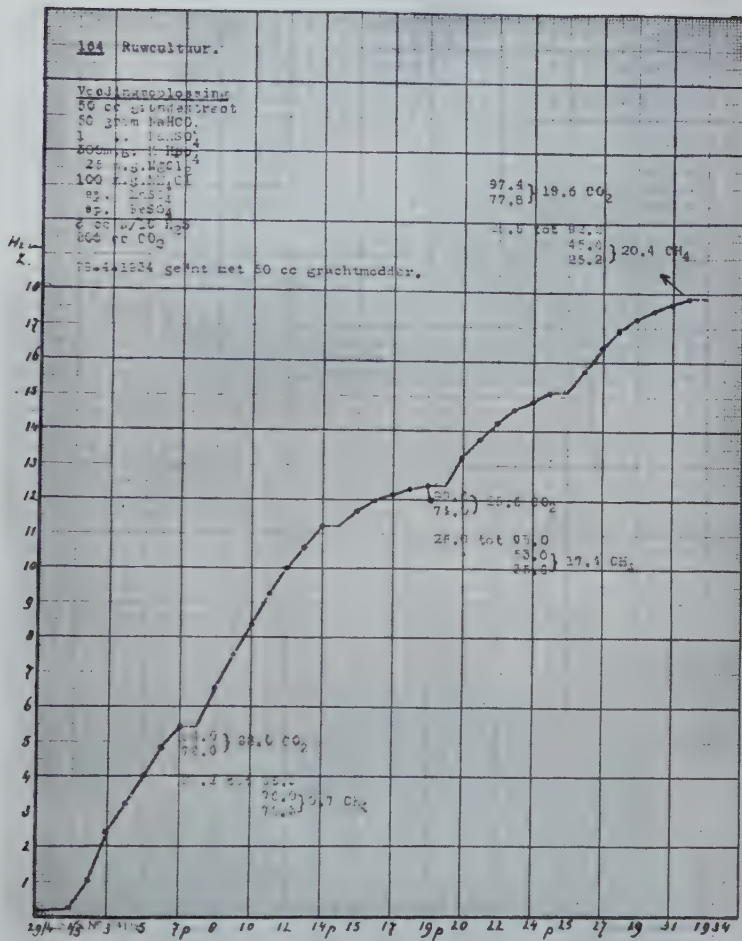


Foto 3. Reincultuur van azijnzuurvormendebacillen.

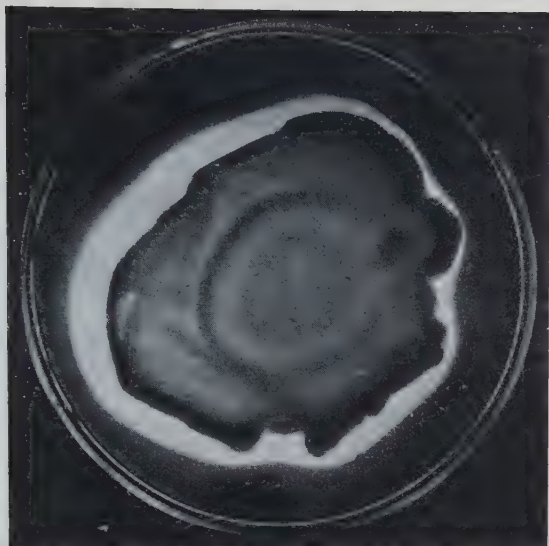


Fig. 1. *Rhizobium mililoti*. Het krijt is rondom de cultuur opgelost. $\pm \frac{1}{2}$ nat. grootte.

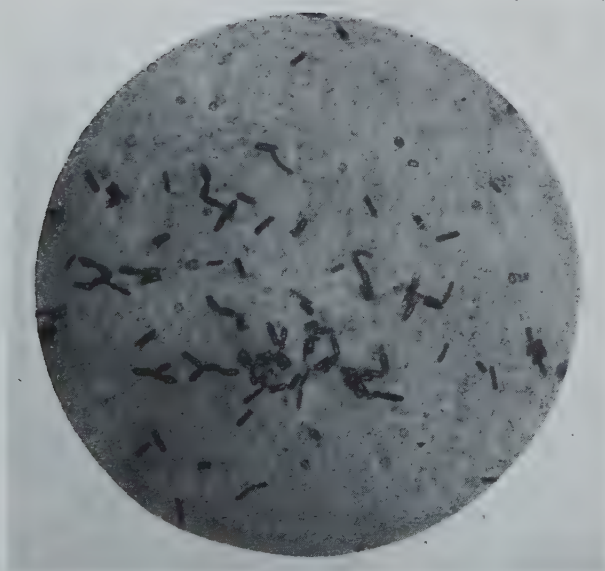


Fig. 2. *Bacillus subtilis* F. Cohn. 1000 x, 24 uur oud, sporen.

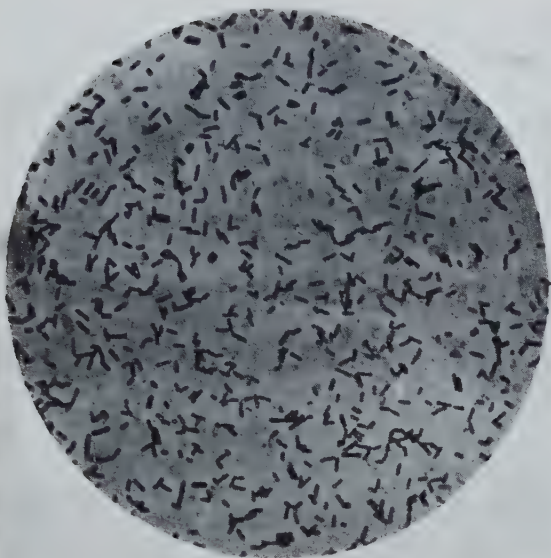


Fig. 3. *Bacillus mesentericus* (Flügge) L. et N. (Onze infectie II) 1000 x, 12 uur oud. Sporen.



Fig. 4. *Bacillus mesentericus* (Flügge) L. et N. (Onze infectie III)
1000 x, 12 uur oud, nog geen sporen.

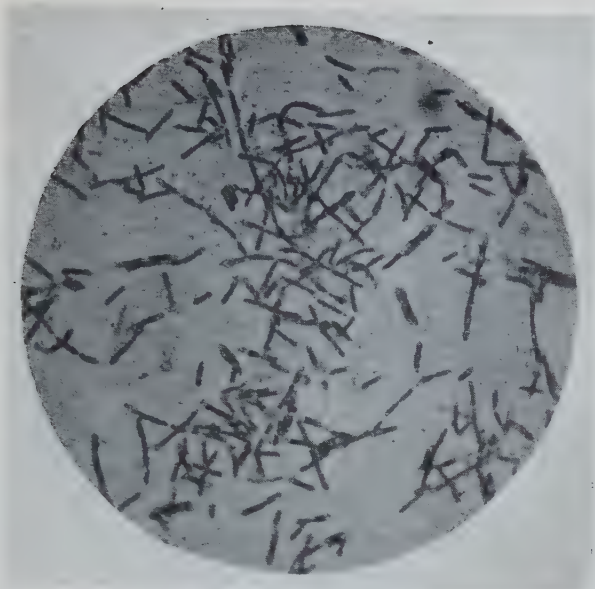


Fig 5. *Bacillus vulgatus* (Flügge) Migula. 1000 x, 24 uur oud; sporen.

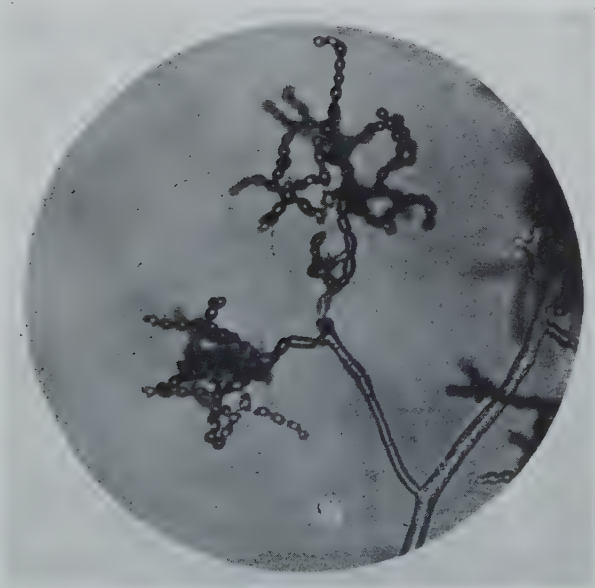


Fig. 6. *Monilia sitophila* Mont. Tak van conidiëndrager met rijpe sporen. ± 90 x, 24 uur oud.

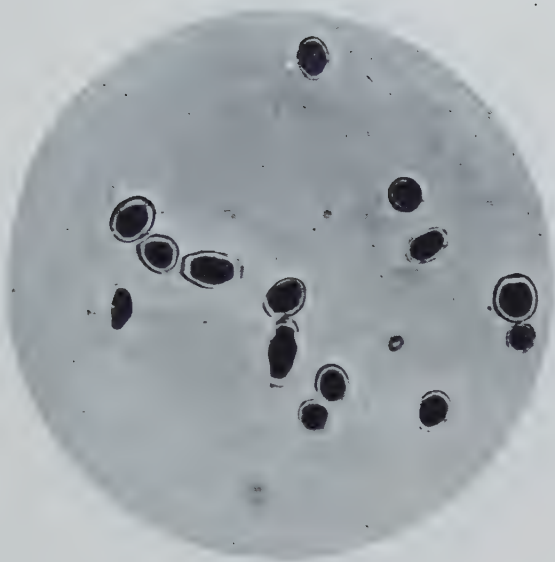


Fig. 7. *Monilia sitophila* Mont. Rijpe sporen. $\pm 90 \times$.



Fig. 8. Melkzuurbacterie met opzwellingen. 3 dagen oud. $1000 \times$.

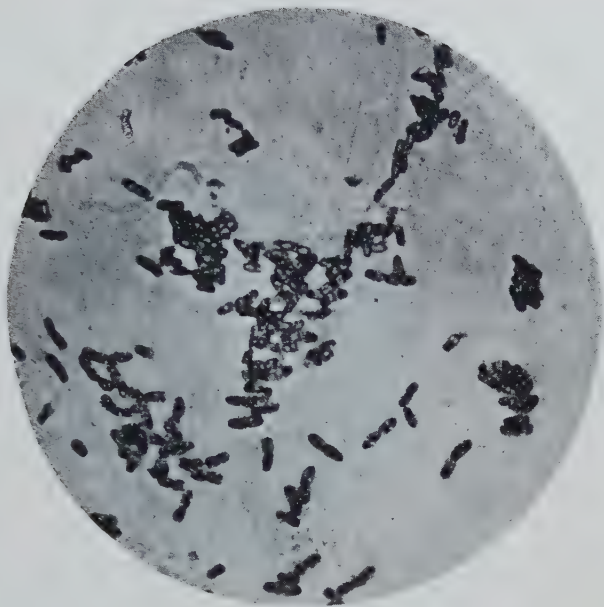


Fig. 9. *Bacillus* sp. 1000 x, 48 uur cud. Sporen.

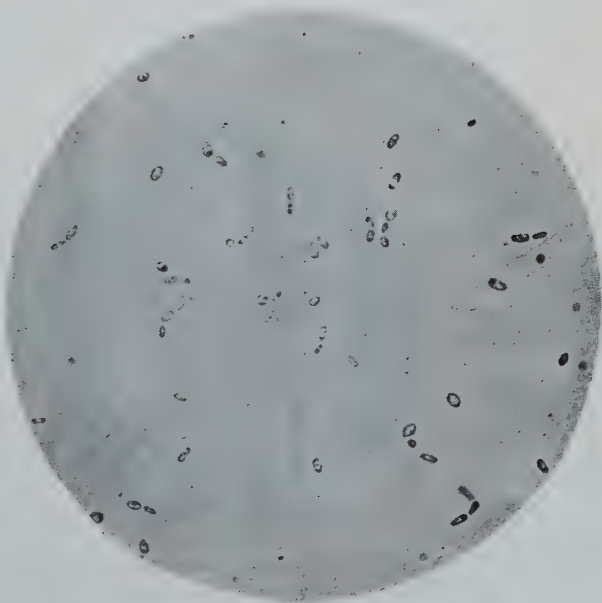


Fig. 10. *Saccharomyces* sp. \pm 450 x.



Fig. 11. *Rhizobium meliloti*. Normale staaf-vorm uit een slijmrijke cultuur. 1000 x, 3 dagen oud,



Fig 12. *Rhizobium meliloti*. Bacteroïdachtige vorm uit een slijmarme cultuur. 1000 x, 3 dagen oud.

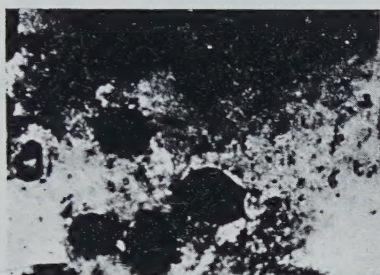


Fig. 1. *Haemophilus* type Cohen-Pittman (subtype b) in het sputum van een patiente met postoperatieve bronchopneumonie.

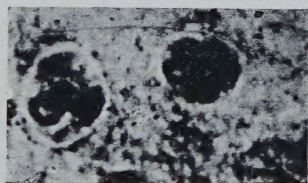


Fig. 2. *Haemophilus* type Cohen-Pittman (subtype c) in hét sputum van een patient met chronische etterige bronchitis met bronchiëctasieën.

